

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Caracterización fenotípica y molecular de la diversidad  
genética de papas cultivadas por su tolerancia al  
endulzamiento en frío**

**TESIS**

**para optar el título profesional de Biólogo**

**AUTOR**

**Carlos Alberto Alvarado Aliaga**

**Lima – Perú**

**2008**

## INDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>I. INTRODUCCION.....</b>	<b>5</b>
I.1 Objetivos.....	8
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>9</b>
II.1 La Papa. Clasificación taxonómica de las papas cultivadas.....	9
II.2 La Papa Nativa.....	10
II.3 Antigüedad y domesticación de la papa cultivada.....	12
II.4 Origen, evolución y migración.....	12
II.4.1 Sobre el origen de la papa.....	12
II.4.2 Evolución y migración.....	14
II.5 Procesamiento.....	16
II.6 Materia seca.....	18
II.7 Azúcares reductores.....	19
II.7.1 Fritura en hojuelas y azúcares reductores.....	21
II.8 Calidad del Producto.....	25
II.8.1 Color de Hojuela.....	25
II.8.2 Sabor.....	26
II.8.3 Textura.....	26
II.8.4 Absorción de aceite.....	27
II.9 Reacondicionamiento.....	27
II.10 Reacción de la Cadena Polimerasa.....	29
II.11 Marcadores Moleculares.....	30
II.12 Técnicas basadas en la hibridación.....	31
II.13 Marcadores Basados en PCR.....	32
II.13.1 Técnicas basadas en PCR que usan iniciadores arbitrarios.....	32
II.13.2 Técnicas basadas en PCR de secuencia específica.....	34
II.13.2.1 Microsatélites.....	34
II.13.2.2 Clasificación de los Microsatélites.....	37
II.13.2.3 Ventajas de los marcadores Microsatélites.....	37

II.13.2.4 Aplicaciones de los microsatélites.....	38
II.13.2.5.- Limitaciones de los SSR.....	39
<b>III MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
III.1 Materiales.....	41
III.1.1 Material biológico.....	41
III.1.2 Material de laboratorio.....	42
III.1.3 Equipos de laboratorio.....	44
III.1.4 Material químico.....	45
III.1.5 Software.....	47
III.2.- Métodos.....	48
III.2.1 Determinación de materia seca.-(Producción de materia seca) .....	48
III.2.2 Fritura.....	48
III.2.3 Absorción de aceite.....	49
III.2.4 Determinación de azúcares reductores. Método de Ross .....	51
III.2.5 Extracción del DNA.....	52
III.2.5.1 Cuantificación y calidad del DNA genómico.....	52
III.2.5.2 Estandarización de la calidad del ADN.....	53
III.2.7 Amplificación de la región de Microsatélites mediante PCR.....	54
III.2.7.1 Obtención de los Marcadores Microsatélites.....	56
III.2.8 Electroforesis de los productos amplificados.....	57
III.2.8.1 Denaturación.....	58
III.2.8.2 Cargado del gel de Poliacrilamida.....	58
III.2.9 Electroforesis.....	58
III.2.10 Detección de los Microsatélites.....	59
III.2.10.1 Primer Lavado.....	60
III.2.10.2 Tinción del Gel.....	60
III.2.10.3 Segundo Lavado.....	60
III.2.10.4 Revelado.....	61
III.2.11.- Caracterización de los alelos.....	61
III.2.12 Registro de patrones de las bandas obtenidas.....	62
III.2.13 Análisis de los Resultados.....	62
III.2.13.1 Coeficiente de asociación.....	63
III.2.13.2 Análisis de agrupamiento.....	63

<b>IV RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
IV.1 Procesamiento.....	65
IV.1.1 Materia seca.....	65
IV.1.2 Fritura.....	67
IV.1.3 Absorción de aceite.....	69
IV.2 Azúcares Reductores.....	72
IV.2.1 Curva Estándar.....	74
IV.3 Comparación entre fritura y contenido de Azúcares Reductores.....	75
IV.4 Contenido de Materia Seca y Absorción de aceite en la fritura.....	76
IV.5 Obtención y caracterización de los marcadores moleculares.....	77
IV.5.1 Identificación de alelos nulos.....	80
IV.5.2 Tamaño de los alelos.....	80
IV.5.3 Determinación PIC y Riqueza alélica en cada locus.....	81
IV.5.4 Casos de iniciadores multi-loci.....	82
IV.5.5 Cultivares que exceden en ploidía.....	84
IV.5.6 Promedio de clases alélicas por genotipo y por ploidía.....	85
IV.6 Análisis mediante NTSYS.....	85
<b>V DISCUSIÓN.....</b>	<b>88</b>
V.1 Materia seca.....	88
V.2 Absorción de aceite.....	90
V.3 Fritura.....	90
V.4 Azúcares reductores.....	92
V.5 Caracterización de los marcadores moleculares.....	95
V.5.1 Alelo nulos.....	95
V.5.2 Alelos que exceden en ploídia.....	96
V.5.3 Alelos multiloci.....	96
V.5.4 Riqueza alélica.....	97
V.5.5 Heterogocidad.....	98
V.6 Interpretación del programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System).....	99
<b>VI CONCLUSIONES.....</b>	<b>101</b>
<b>VII RECOMENDACIONES.....</b>	<b>102</b>

<b>VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>103</b>
<b>GRÁFICOS.....</b>	<b>122</b>
<b>Gráfico 1</b> Materia seca de 40 cultivares nativos de papa en tres tratamientos.....	<b>122</b>
<b>Gráfico 2</b> Color de hojuelas de 40 cultivares nativos de papa en tres tratamientos...	<b>123</b>
<b>Gráfico 3</b> Contenido de azúcares reductores de 40 cultivares nativos de papa en tres tratamientos.....	<b>123</b>
<b>Gráfico 4</b> Contenido de absorción de aceite de 40 cultivares nativos de papa en tres tratamientos.....	<b>124</b>
<b>Gráfico 5</b> Comparación de color de hojuela y contenido de azúcares reductores 10 días después de la cosecha.....	<b>124</b>
<b>Gráfico 6</b> Comparación de color de fritura y contenido de azúcares reductores 90 días después de la cosecha temperatura ambiente almacén (T.A.) .....	<b>125</b>
<b>Gráfico 7</b> Comparación de fritura y contenido de azúcares reductores 90 días cámara fría almacén (C.F. 4°C) .....	<b>125</b>
<b>Gráfico 8</b> Comparación del contenido de materia seca y absorción de aceite a 10 días después de la cosecha.....	<b>126</b>
<b>Gráfico 9</b> Comparación del contenido de materia seca y contenido de absorción de aceite a 90 días temperatura ambiente almacén (T.A.) .....	<b>126</b>
<b>Gráfico 10</b> Comparación de materia seca y la absorción de aceite a 90 días cámara fría almacén (C.F. 4°C) .....	<b>127</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>128</b>
<b>ANEXO 1</b> Protocolo de extracción de ADN por el Método CTAB (CIP,1997).....	<b>128</b>
(CIP 1997).....	<b>128</b>
<b>ANEXO II.</b> Electroforesis de agarosa (CIP, 2000).....	<b>131</b>
<b>ANEXO III</b> Preparación del marcador Fago Lambda cortado con PstI (CIP,2000)...	<b>132</b>
<b>ANEXO IV</b> Preparación de gel de poliacrilamida para la electroforesis de ADN.....	<b>132</b>
<b>ANEXO V</b> Protocolo de secuenciamiento para pUC- 18 (Promega corporation, 2000).....	<b>135</b>
<b>ANEXO VI</b> Detección con tinción de plata.....	<b>136</b>
<b>ANEXO VII</b> Correlaciones.....	<b>138</b>

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Amplified fragment lenght polymorphism (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados.
bp	pares de bases
CIP	Centro Internacional de la Papa
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
dATP	Desoxiadenina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
ddNTP	Didesoxirribonucleósido
dNTP	Desoxirribonucleósido
EDTA	Etilen diamine tetra-acetic acid (ácido etilen-diamino-tetra-acético)
GCIAL	Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional.
LTS	Low Temperature Sweeding)
ug	microgramo
ul	microlitro
uM	micromolar
ng	nanogramos
msnm	metros sobre le nivel del mar
NTSYS	Numerical taxonomic system (sistema para taxonomía numerica)
OTU	Operative taxonomic unit (Unidad taxonómica operative)
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
RAPD	Random amplified polymorphism DNA (polimorfismo en el ADN amplificado aleatoriamente.
RFLP	Restriction fragment lenght polymorphism (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)
SDS	Sodium dodecil sulfate (dodecil sulfato de sodio)
SSR	Simple séquence repeat (secuencias simples repetidas)

STMS	Sequence-tagged microsatellite site (microsatélite como secuencia blanco)
STR	Short tandem repeat (repetición corta en tándem)
STS	Sequence-tagged site (secuencia blanco específica)
TBE	Tris-borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N' – Tetra-metil etilen di-amina
UPGMA	Unweigthed pair-group meted using aritmethic averages (Método de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas)
VNTR	Variable number of tandem repeats (número variable de repeticiones en tándem)

## RESUMEN

Al exponer el tubérculo de papa a temperaturas inferiores a los 7 °C, ocurre lo que se conoce como “endulzamiento por frío”. Este daño fisiológico, es la principal causa de rechazo de lotes de papa serrana para la industria, consiste en la acumulación de azúcares reductores (glucosa y fructosa) como resultado de la sucesiva degradación del almidón y sus componentes. Para ver la calidad de una papa almacenada en frío, sus niveles de azúcar deberán incrementarse en lo mínimo o no variar, para no perder su potencial como producto agroindustrial, caso contrario serviría para el procesamiento solo después de la cosecha. Por ello en el presente trabajo de tesis se seleccionó cultivares nativos de papa tolerantes al endulzamiento en frío, mediante su análisis fenotípico, bioquímico y molecular. Esto se desarrolló en las instalaciones del Centro Internacional de la Papa (CIP), en los laboratorios de Procesamiento, Fisiología y de Biología Molecular de la División de mejoramiento de cultivos. Se trabajó con 40 cultivares de papas nativas, seleccionadas anteriormente por su calidad de fritura teniendo como referente la relación entre: materia seca, fritura y azúcares reductores.

Primeramente se determinó los parámetros de procesamiento: color de fritura, contenido de materia seca, contenido de aceite después de la fritura. Luego el análisis bioquímico con la cuantificación del contenido de azúcares reductores por el método de Frank Ross. Estas evaluaciones se aplicaron a los siguientes tratamientos 1) papas diez días después de la cosecha, 2) papas almacenadas en cámara fría (C.F.) a 4°C por noventa días después de la cosecha y 3) papas almacenadas a temperatura ambiente (T.A.) por noventa días después de la cosecha. Finalmente el análisis molecular se hizo, utilizando 18 secuencias microsatélites distribuidas sobre el genoma, y estas fueron seleccionadas por su alto grado de polimorfismo.

De este estudio se han identificado cultivares nativos de papas con buenas características para el procesado en los tres tratamientos, estas características son: alto contenido de materia seca, bajo contenido de azúcares reductores, siendo estos factores determinantes para la industria del procesado de papa fritas en hojuelas, así como también bajo



contenido de absorción de aceite en la fritura. Se determinó que las papas que tienen un rango de fritura entre [1-2] (según escala de colores de fritura), tienen un bajo contenido de azúcares reductores, y que al ser almacenadas en frío conservan su calidad de fritura y la variación de los azúcares; en la mayoría de casos se mantuvo estable con pequeña variación, haciéndoles que ciertas cultivares potenciales para la industria de hojuelas fritas de papa. Existiendo una correlación alta entre fritura y contenido azúcares reductores ( $r = 0,83$ ;  $r = 0,68$  y  $r = 0,73$ ); así como también entre materia seca y contenido de absorción de aceite ( $r = -0,52$ ;  $r = -0,56$  y  $r = -0,53$ ) en los tratamientos realizados respectivamente.

Se observó que estos iniciadores fueron suficientes para diferenciar los 40 cultivares nativos de papa. Los contenidos de información polimórfica PIC variaron desde 0.361 para el iniciador S020 hasta 0.848 para el iniciador S084. Se determinó 4 iniciadores multiloci: S011, S042, S095 y S101. El agrupamiento de individuos se realizó mediante promedios aritméticos no ponderados entre grupos por pares UPGMA (NTYSSpc 2.02h), aplicados a la matriz de similaridad obtenida con el coeficiente de DICE. Se hizo un análisis de agrupamiento, obteniéndose para el sistema de marcadores SSR un valor de similitud que varía desde 0.262 a 0.964 para los 40 cultivares nativos de papa. Finalmente no se encontró ninguna relación entre marcadores morfológicos y genéticos.

## ABSTRACT

When potato tubers are exposed to temperatures lower than 7 °C, a process known as “Low Temperature Sweetening” takes place. This physiological damage involves the accumulation of the reducing sugars (glucose and fructose) as a result of successive degradation of the starch and its components, and is the principal reason native potato crops are rejected by industry. To maintain its potential as an agroindustrial product, a potato should be processed quickly (before sugars can accumulate) or be cold tolerant so if cold stored, will not change its levels of sugars much. To address this issue, the present thesis work selected native cultivars of potato resistant to cold induced sweetening, and characterized them phenotypically, biochemically, and genetically. This was done at the International Potato Research Institute (CIP), in the laboratories of the Processing, Physiology, and Molecular Biology Division of the department of Germplasm Improvement. There were 40 varieties of native potatoes, selected previously for their frying quality, dry matter content, and reducing sugar content.

The criteria for processing quality were previously determined to be: color of frying, dry matter content, and oil absorption capacity. The biochemical analysis of reducing sugar content was done using the Frank Ross method. These evaluations were applied to the following treatments 1) potatoes 10 days after harvesting, 2) cold stored potatoes (C.F) 4°C for ninety days after harvest., and 3) potatoes stored at room temperature (T.A.) for ninety days after harvest. The genetic analysis was done, using 18 microsatellite markers distributed throughout the genome, and these were selected for their high degree of polymorphism.

From this study, we found native potatoes have good characteristics for processing. These characteristics were high dry matter content and low reducing sugar content; these are the most important factors for industry in potato flake frying, as well as low oil absorption during frying. It was determined that potatoes that have an optimum frying range between 1-2 (based on the frying color range) have a low reducing sugar concentration, and that being stored in the cold conserves their quality of frying and maintains their reducing sugar content; sugar levels generally stayed stable with little variation, making certain cultivars potentially

good for potato flake frying. It was found that there was a correlation high correlation between frying quality and reducing sugar content ( $r = 0,83$ ;  $r = 0,68$  y  $r = 0,73$ ); this relationship was also found between dry matter content and oil absorption ( $r = -0,52$ ;  $r = -0,56$  y  $r = -0,53$ ) in the trials conducted.

It was observed that the indicators were sufficient to differentiate between 40 cultivars of native potatoes. The PIC polymorphic data showed variation between 0.361 for the indicator S020 until 0.848 for the indicator S084. It was determined that the 4 multilocus indicators, S011, S042, S095, and S101 were useful in this study. The grouping of individuals was made possible using UPGMA methods (NTSYSpc 2.02h), applied to the matrix of similarity obtained with the coefficient DICE. It was done using a grouping analysis that varied from 0.262 to 0.964 for the 40 native cultivars of potato. Finally, it was not found that there was any correlation between morphological and genetic markers.

## I INTRODUCCIÓN

La papa es un cultivo superior a todos los otros en la producción de proteína por unidad del tiempo y superficie, y en la producción de energía (Estrada, 2000). Las proteínas que presenta son particularmente valiosas debido a su alto valor biológico, la cual no es común en las proteínas de otras plantas. Es una fuente rica en fibra, minerales, vitaminas C y una alta proporción de aminoácidos esenciales dependiendo de las variedades. Una vez introducida en régimen nuevo, es relativamente fácil adaptarla en los sistemas de cultivos y rotación. (Estrada, 2000).

La papa es uno de sus principales productos oriundos del Perú, quizás ningún alimento ha cruzado tantas fronteras ni ha tenido tanta injerencia en la historia de la humanidad como la papa y ahora representa uno de los mayores productos alimenticios del mundo ocupando hoy en día en el ámbito mundial el cuarto cultivo más importante para su consumo después del trigo, maíz y arroz.

El Perú es el país de mayor diversidad genética en especies de papa silvestre y cultivada y esa fue la razón principal para el establecimiento en 1971 en Lima del Centro Internacional de la Papa (CIP), por parte del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (GCIAL). Sin embargo, la mayoría de estos cultivares de papas nativas son poco conocidos y sólo de uso comunal y producidas para subsistencia. De las miles de cultivares nativos existentes, solo unas cuantas llegan a los mercados locales tal es el caso de los huayros y amarillas, que tienen un desarrollo comercial importante (Álvarez y Repo, 1999). En la zona andina se cultivan cientos de cultivares de papas nativas, muchas de ellas en peligro de extinción. El gran reto consiste en preservar esta valiosa diversidad en favor de todos: productores, consumidores e investigadores. Es fundamental contar con mercados específicos para que estas papas sigan siendo cultivadas en los campos altoandinos. Por las pobres condiciones económicas de los campesinos y por la cada vez mayor demanda o disponibilidades de variedades mejoradas con rendimientos más altos; los cultivares nativos de papa son una alternativa; por lo que se está tratando de identificar nuevos usos potenciales para esa diversidad genética que han conservado los campesinos de la zona andina por sus

buenas cualidades que éstas presentan específicamente para el procesamiento. La selección correcta de las cultivares nativos de papa, más adecuada está en función al destino final (uso agroindustrial o consumo en fresco)

Para resolver las demandas en la agroindustria y para asegurar una fuente constante del producto sin procesar, las papas se guardan a bajas temperaturas menores a 7 °C; sin embargo las bajas temperaturas, causan la degradación de almidón a azúcares principalmente reductores: glucosa, fructosa y sacarosa, en varios niveles, dependientes de factores ambientales y genéticos. Esto es llamado endulzamiento en frío LTS, (Low Temperature Sweetening) (Es y Hartmans, 1987; Morell y Rees, 1986; Rees *et al.*, 1981; Ross y Davies, 1992. La dulcificación a bajas temperaturas es un problema importante para la industria de procesado de papa., ya que la oscuridad a la fritura es el resultado de una interacción de los azúcares reductores con los aminoácidos libres (llamados las reacciones de Maillard).

En el proceso para determinar el contenido de azúcares reductores después de la cosecha, los tubérculos son almacenados a baja temperatura y medio ambiente, donde ocurre un endulzamiento natural, ya que en este proceso de defensa y respiración celular, se activan dos o más rutas metabólicas que van a producir azúcares, de esta manera: la sucrosa sintetasa consume en exceso ATP por una vía de la respiración, se incrementa la actividad de la enzima sucrosa sintetasa, incrementa la actividad de la enzima invertasa que convierte sucrosa a hexosas, incremento de la actividad de la enzima que degrada almidón y queda inducida la síntesis de sucrosa por inhibición de la glicólisis. Este proceso da la característica del color de fritura, dando calidad final al producto, tanto en hojuelas como papa frita. (Yaptenco *et al.*, 1999).

El estudio de los factores de calidad como son: contenido materia seca y contenido de azúcares reductores principalmente, nos da pautas para el uso de estas cultivares nativos de papa en la agroindustria, ya que estos, contienen alta concentración de materia seca muy superior a la papa mejorada así como también, muy baja concentración de azúcares reductores incluso después de su almacenamiento en frío y a temperatura ambiente (su variación

cuantitativa es mínima), siendo estas dos características fundamentales en la industrialización, y esto es debido a su diversidad genética, que presentan estos cultivares nativos.

En la búsqueda de esas cualidades que satisfagan tanto a la industria así como también a los agricultores, consumidores e investigadores, el Centro Internacional de la Papa (CIP), está en el proceso de selección de cultivares nativos de papa con muy buenas condiciones para el procesado, y es una atractiva propuesta para el sector agro industrial, ya que estas cultivares presentan además: buena textura, pulpa de distintos matices de colores y un sabor muy agradable, además que muchos de estos son resistentes a heladas, sequías, haciéndolas potencialmente comerciales.

El presente estudio es parte de un trabajo que viene realizándose en el CIP, para ver el uso potencial de los cultivares nativos de papa con alto valor nutricional e industrial de las especies: *S. tuberosum ssp. andigena*, *S. stenotomum*, *S. goniocalyx*, *S. chaucha*, *S. juzepczukii*, y *S. curtilobum*, y ver luego sus características de materia seca, fritura, extracción de aceite, azúcares reductores y diversidad genética usando marcadores moleculares microsatélites SSRs.

Si bien es cierto no hay posibilidad por el momento de competir con productos elaborados que importamos ya sea en hojuelas, purés, almidón etc. Pero tenemos la materia prima necesaria para poder mejorarlos y poder contribuir al desarrollo de nuestro país, elaborando al menos un producto natural de calidad y su posible exportación. Además las papas nativas no solo representan un banco tremendo de diversidad genética sino que permite a los agricultores aprovecharlas en diferentes ambientes, condiciones, tecnologías, usos y mercados para su producción. Además, su mayor uso puede contribuir a la valorización y conservación genética por los mismos agricultores, siendo una excelente alternativa para los bancos de germoplasma 'ex-situ' de los programas internacionales y nacionales de mejoramiento (Bonierbale, 2002).

## **I.1 OBJETIVOS**

- Caracterizar fenotípicamente cultivares nativos de papa seleccionados con aptitudes superiores para la elaboración de productos procesados, por sus contenidos de materia seca y tolerancia al endulzamiento en frío.
- Cuantificar el contenido de azúcares reductores y caracterizar la calidad y color de fritura, de estos cultivares nativos en los tres tratamientos: a) 10 días después de la cosecha, b) Cámara fría 4 °C por 90 días, c) Cámara temperatura ambiente por 90 días para dar a conocer el valor de éste grupo de papas nativas para el proceso agro industrial, específicamente para la producción de hojuelas fritas o chips de formas y colores diversos.
- Estimar la similitud genética (parentesco) de papas nativas con aptitud para procesamiento, con respecto a un grupo de variedades comerciales y representantes del banco de germoplasma del CIP mediante marcadores moleculares microsatélites.

## II ANTECEDENTES

### II.1 La Papa. Clasificación taxonómica de las papas cultivadas

Las papas silvestres y cultivadas están clasificadas dentro de la Posición Taxonómica siguiente:

Reino	:	Vegetal
División	:	Fanerógamas
Subdivisión	:	Angiospermas
Clase	:	Dicotiledóneas
Subclase	:	Simpétalas
Sección	:	Anisocárpeas
Orden	:	Tubifloríneas
Familia	:	Solanaceae
Género	:	Solanum
Sección	:	Petota
Subsección	:	Potatoe
Especie	:	Solanum spp

(Tomado de Huamán y Ross, 1985)



## II.2 La Papa Nativa

Las papas nativas son fruto del proceso de domesticación, selección y conservación realizado por los antiguos habitantes andinos.

Las papas nativas deben ser consideradas como un cultivo diferente al de las papas mejoradas. Ya que presenta mejor calidad culinaria y alto porcentaje de materia seca. Las papas nativas crecen en los Andes, especialmente en Perú y Bolivia, en alturas que fluctúan entre los 3,000 a 4,000 msnm. y sus requerimientos de suelos son muy específicos y son más susceptibles a enfermedades como roña, carbón, verruga, rancho y a insectos como la polilla y el gorgojo (Túpac Yupanqui, 2001).

Gran parte de las papas nativas tiene menor potencial de rendimiento que la papa común. Por otro lado, su calidad es siempre superior, lo que compensa con creces su menor rendimiento, pues su precio es superior y mucho más estable en el mercado (Otazú, 2001).

En los andes peruanos la diversidad genética de la papa es cultivada en dos sistemas; unas pocas variedades nativas más o menos de 5 a 8 son cultivadas con fines comerciales dentro de ellas tenemos a las conocidas como: “amarillas”, “huayros”, “camotillo”, “huamantanga”, “peruanita”. El otro grupo mas numeroso, diverso es sembrado por los campesinos en forma de mezclas, esta forma de siembra es denominado: “chagro”, donde generalmente cada familia siembra entre 10 a 100 cultivares (Fig. 1), esta forma lo hacen con el fin de asegurar la productividad y contrarresta factores adversos como sequías prolongadas, heladas, enfermedades en general (estrés abiótico o abiótico), asegurando así su cosecha. (Amorós, comunicación personal).



**Figura II.1** Sembrío de cultivares nativos de papa bajo la modalidad de mezclas.

El Centro Internacional de la Papa (CIP), que tiene su sede principal en el Perú, conserva una de las colecciones de papa más grandes del mundo. De las 3,833 variedades de papas nativas provenientes de 9 países de América Latina que conserva en custodia, casi 2000 son del Perú. La única forma de asegurar la sostenibilidad de la conservación de las papas nativas y otros cultivos andinos en los campos de los agricultores (in-situ) es mediante la promoción del consumo en los mercados urbanos por su gran diversidad de formas, colores en la pulpa y cáscara y mas importante aun, su excelente calidad culinaria (Huamán, 2000).

Estas papas nativas se siembran en la zona andina sobre los 3000 msnm. hasta los 4500 msnm. y está restringida a zonas agroecológicas específicas de los Andes con suelos de alto contenido de materia orgánica, donde las condiciones ambientales son severas (sequías, heladas, granizadas, etc.). Normalmente estas papas se siembran en suelos con largos periodos de rotación, escaso o nulo uso de productos químicos, solamente el guano de corral, usando métodos tradicionales con herramientas ancestrales.

## **II. 3 Antigüedad y domesticación de la papa cultivada**

La papa según datos obtenidos de estudios con C-14 fue domesticada hace por lo menos 10,000 años en el altiplano, al sur este de Perú y noreste de Bolivia (Engel, 1970).

No se conoce con exactitud la especie silvestre que dio origen a las especies cultivadas diploides. Es posible que esa especie desapareciera al cruzarse con otras especies semicultivadas o silvestres. Varias especies silvestres se han citado como ancestros de las cultivadas, entre ellas *S. leptophyes*, *S. canasense*, *S. sparsipilum* (Hawkes, 1978b), *S. brevicaule* y *S. vernei* (Grun, 1990).

La mayor cantidad de especies de papas diploides tanto en silvestres como en cultivadas indicaría que la evolución de las papas cultivadas haya sido en la dirección diploide a pentaploide, ya que estas presentan la mayor cantidad de especies en comparación con las demás papas poliploides, indicando además estas serían las más primitivas y las pentaploides más actuales (Vásquez, 1988)

## **II. 4 Origen, evolución y migración**

### **II.4.1 Sobre el origen de la papa**

Vavilov, N.I (1951), señala 8 centros de origen de todas las especies cultivadas: América Central y México, Sudamérica (área Andina, Brasil-Paraguay y Chile), Área mediterránea, Etiopía, Asia Central, Oriente, China, India e Indo-Malasia. Sostiene que el centro de origen de una especie está allí donde se encuentra una mayor variación en sus formas cultivadas y silvestres. El mismo autor considera que la papa cultivada tuvo dos centros de origen: el centro de origen de Chiloe, donde está la papa *Solanum tuberosum* y el centro de origen

Ecuador, Perú y Bolivia donde están representadas las papas cultivadas andinas *Solanum andigenum*.

Hawkes (1967), en sus largos recorridos manifiesta que la región del Lago Titicaca sería el centro del origen de la papa cultivada por la existencia de gran número de especies. Al igual que las variedades cultivadas; ahí habría nacido la agricultura más primitiva de la papa u otras tuberosas.

Bukasov (1981), dice que el primer genocentro principal de las subsecciones Sudamericanas de *Tuberosarium* está localizada en los altiplanos adyacentes a Perú y Bolivia. Un centro secundario sudamericano está en la costa del Pacífico de Chile y en las islas adyacentes.

El origen de las papas cultivadas se remonta a las variedades nativas desarrolladas por los agricultores precolombinos a partir de especies que crecían en estado silvestre. La evidencia arqueológica sitúa los primeros indicios del cultivo alrededor del lago Titicaca hace unos 7,000 años, centrado en un grupo de aproximadamente 20 especies silvestres morfológicamente similares relacionadas con el complejo *Solanum brevicaule*, que están distribuidas desde el centro del Perú hasta el norte de Argentina.

Un artículo publicado recientemente por David M. Spooner (2006), botánico del Servicio de Investigación Agrícola que trabaja en la Universidad de Wisconsin y sus colaboradores del Instituto Escocés de Investigación en Cultivos, brinda una respuesta a esa incógnita usando análisis genéticos de especies silvestres y variedades nativas recolectadas a lo largo y ancho de los Andes. El artículo llega a la conclusión de que hubo un punto de origen único de las papas cultivadas al norte del lago Titicaca, en el sur peruano, desafiando de esa manera teorías previas sobre orígenes múltiples. Spooner y sus colaboradores analizaron la composición genética de 365 variedades locales, sus supuestos progenitores y grupos asociados, usando una técnica molecular denominada polimorfismo de la longitud de los

fragmentos de la amplificación. La evidencia demostró que todas las papas cultivadas tienen un origen único derivado de la parte norte del complejo *S. brevicaule* (Spooner, 2005)

#### **II.4.2 Evolución y migración**

La segunda década del siglo XX fue singularmente notable en el descubrimiento de las especies silvestres de papas peruanas a raíz de las publicaciones del botánico alemán Georg Bitter (Ochoa, 1989).

En 1913, David Fairchild, del Departamento de Agricultura de Estados Unidos USAD, envió exploradores y recolectores de plantas silvestres y cultivadas para América del Sur, África y Asia; para América del Sur fue enviado W.F. Wight quien recolectó abundante y diverso material incluyendo papas silvestres y cultivadas (USDA, 1916), lo que significó un destacado momento en la historia de la papas peruanas su estudio y aprovechamiento (Ochoa, 1999)

En 1939, el gobierno de Gran Bretaña envió una expedición integrada por E.K. Balls, W. Balford Gourlay y J.G. Hawkes, hacia Méjico, Argentina, Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia (Hawkes, 1941).

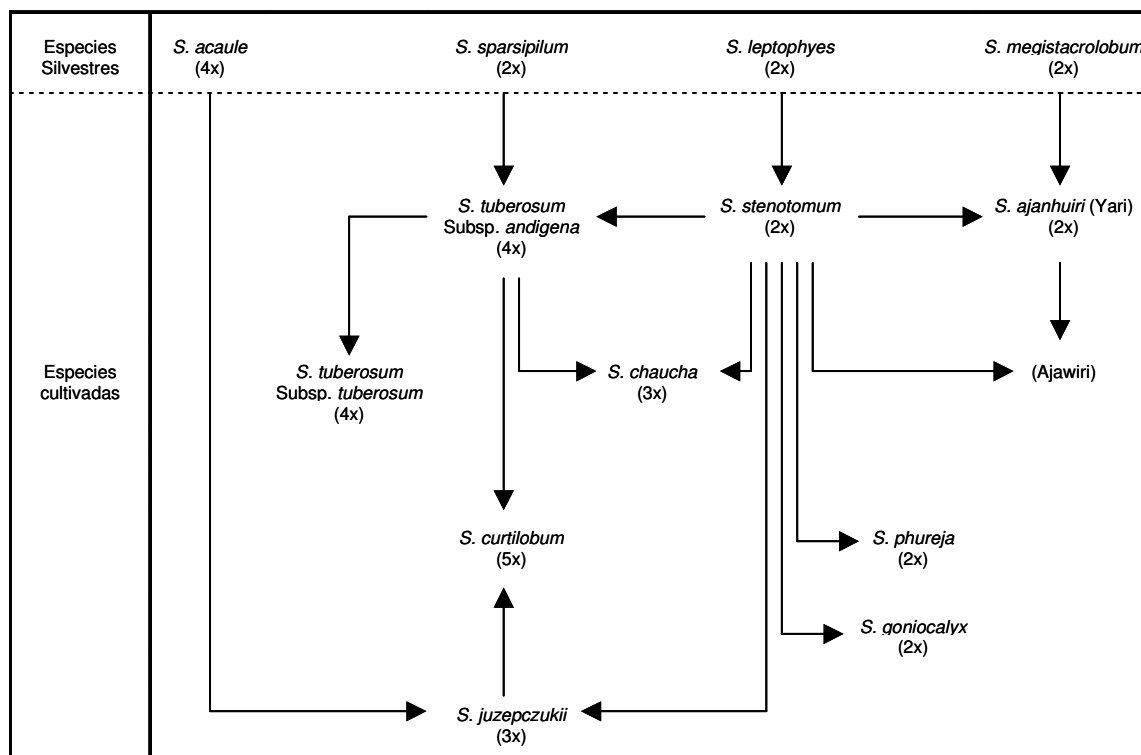
El primer intento de clasificación de las papas fue hecho por Fortunato L. Herrera, en 1921, basándose en el agrupamiento de papas indígenas silvestres en el departamento del Cusco, el los clasificó en papas dulces, amargas y silvestres. Las dulces y amargas las subdividió, en papas redondas, alargadas, planas y enroscadas (Herrera, 1921).

Debido a la alarmante erosión genética quien procedió a la recolección, dando prioridad al material cultivado nativo de la región andina y los pocos cultivares que podían encontrarse en América Central y Méjico. Después de

muchas expediciones auspiciadas por el CIP, a las más importantes regiones paperas de los Andes Sudamericanos, incluyendo los archipiélagos de Chiloé, Chonos y la Isla Juan Fernández de Chile, se logró reunir una colección viva de 15,000 muestras incluyendo donaciones. Los materiales fueron recolectados en Argentina, Bolivia, Colombia, Chile, Ecuador, Venezuela, Guatemala y México y representa la colección viva más completa que existe de las papas primitivas cultivadas. La clasificación hecha en esta colección dio como resultado la presencia de ocho especies: *S. tuberosum*, *S. sthenotunum*, *S. goniocalix*, *S. phureja*, *S. ajanhuiri*, *S. chaucha*, *S. juzepczukii*, *S. curtilobum* (Ochoa, 1975; Huamán 1986). Por el gran número de duplicados de un mismo genotipo y el enorme costo se procedió a su reducción. Se agrupó morfológicamente (características visibles) y luego se verificó con el análisis electroforético. Se contó con la valiosa colaboración del profesor Hermann Stegemann, Alemania, donde se enviaron miles de muestras para el análisis electroforético.

Se puede decir con certeza que este cultivo ha sido la base de las civilizaciones y culturas andinas, ya que sin ella estas culturas hubieran perecido. (Vásquez, 1988).

Al parecer solo cuatro especies silvestres dan lugar a las especies hoy conocidas de las papas nativas: *S. acaule*, *S. sparsipilum*, *S. leptophyllum* y *S. megistacrolobum*. (Figura II.2)



**Figura II.2** Esquema de las relaciones evolutivas de las especies cultivadas de papa y sus niveles de ploidía (adaptada de Hawkes, 1990).

## II.5 Procesamiento

Hasta hace poco la papa alimentaba principalmente los mercados domésticos, pero el meteórico crecimiento de la industria de comidas rápidas está aumentando la demanda global y convirtiendo la papa en una gran mercancía (materia prima) de exportación para las compañías dedicadas al comercio de semillas. Durante los últimos 30 años, el crecimiento espectacular del mercado de alimentos procesados y comidas rápidas ha llegado a dominar la forma de cultivar la papa en Europa Occidental, los EE.UU. y Canadá.

Casi todo el mercado americano está extremadamente concentrado, con sólo 3 compañías responsables de casi todo el mercado norteamericano. Esta concentración les da un enorme control del cultivo y obliga a los agricultores a la vulnerable posición

de producir por contrato. El procesador contrata a los agricultores para que produzcan ciertas variedades en condiciones dadas y a un precio determinado antes de la cosecha o del comienzo de la estación. Esta es una estrategia de alto riesgo para los agricultores porque el cultivo es muy susceptible a las enfermedades y depende mucho del uso de agroquímicos. En Europa los supermercados están extendiendo esos contratos para las papas de mesa igual que para las procesadas. (Grain, 2002).

Al igual que ocurre en el Perú, la mayor concentración de papa para el procesamiento en hojuelas es procesada por grandes compañías, su producción lo hace por contrato en la mayoría de los casos, con condiciones de alguna manera favorables para los agricultores por el precio superior en el mercado, asesoría técnica, y semilla certificada. Pero no siempre las condiciones son favorables, ya que pueden influir factores externos, como: heladas, sequías, granizadas, exceso de lluvias, enfermedades y haciéndolas inservibles para el procesamiento y por ello no comprando su producto, perjudicando al agricultor. Este es uno de los factores fundamentales que se quiere corregir y no salir perjudicado ninguna de las partes.

En la búsqueda de esas cualidades que satisfagan tanto a la industria así como también a los agricultores, el CIP esta en el proceso de selección de variedades nativas con muy buenas condiciones para el procesado, y siendo una atractiva propuesta para el sector agro industrial, ya que estos cultivares nativos presentan buena calidad de material seco un bajo contenido de azúcares reductores, textura, pulpa de distintos matices de colores y un sabor muy agradable, en lo agronómico son resistentes a heladas, sequías, haciéndolas potencialmente comerciales. (Amorós *et al.*, 2001).

Cultivares nativos de papa resistentes al endulzamiento en frío brindarían beneficios económicos para el agricultor, como son la estabilidad de la calidad del cultivo y el producto, eliminando así la necesidad de aplicar inhibidores de brotamiento, menores pérdidas de peso o daño directo del frío, y menos problemas patológicos asociados con los cambios fisiológicos del tubérculo en el almacén. (Sowokinos, 2001)



## II.6 Materia seca

La materia seca es el principal factor de calidad que deben de tener los tubérculos, para la industria del procesamiento.

Ewing (1977), dice que a mayor porcentaje de contenido de materia seca se obtiene mayor cantidad de producto procesado, indica también que las concentraciones de materia seca varía con la variedad y las condiciones ambientales, menciona que altos contenidos de materia seca esta asociado con temperaturas bajas. Moreno (2000), dice el contenido en materia seca determina el rendimiento del producto terminado. Así por ejemplo, aumenta el rendimiento de las hojuelas por menores pérdidas cuantitativas de evaporación de agua, mientras que disminuye la retención de aceite en la fritura. Esto es importante, tanto para la economía como para la nutrición fisiológica.

Rastovski, A. y Van Es (1981), a su turno señala que el contenido de materia seca varía entre tubérculos de diferentes variedades también entre tubérculos de una misma variedad que hayan sembrado a diferentes ambientes y además de una misma planta según la edad del tubérculo (varia dentro de un mismo tubérculo, zonas de la pulpa)

Vásquez (1988), señala que el contenido de material seca en promedio de los tubérculos está en el rango de 13.7% y 27%, pero agrega que en el Perú hay variedades nativas que alcanzan 34.8%, y es debido al factor ambiente que tienes algunas zonas andinas.

Comparando la función molecular para los genes que funcionan en metabolismo de los carbohidratos y el transporte con un mapa de QTL, para el contenido de almidón del tubérculo, indica un número de genes candidatos para este carácter importante (Chen *et al*, 2001)

## II.7 Azúcares reductores

Para resolver las demandas en la agroindustria y para asegurar una fuente constante del producto sin procesar, las papas se guardan a bajas temperaturas, usualmente entre 4°C y 10°C, los tubérculos acumulan la sucrosa, la fructosa y la glucosa en varios niveles, dependientes de factores ambientales y genéticos (Coffin *et al.*, 1987).

En esta dulcificación a bajas temperaturas y que es un problema importante para la industria de proceso de papa. Este oscurecimiento a la fritura es el resultado de una reacción química de los azúcares reductores con los aminoácidos libres y se denomina reacción de Maillard (Gray y Hughes, 1982; Storey y Davis, 1992; Dills, 1993).

Las bajas temperaturas, sin embargo, causan la degradación de almidón a azúcar y al aumento del dulzor en los tubérculos (Low Temperature Sweetening en ingles, LTS) (van Es y Hartmans, 1987; Morell y Rees, 1986; Rees *et al.*, 1981; Ross y Davies, 1992)

Como la respiración es un fenómeno enzimático, la temperatura influye en dicho proceso. A valores de temperatura baja o igual a 4°C, el almidón se convierte en sacarosa y hexosas fosfato, con pérdida de 8% a 9% del almidón original, se logra inhibir la brotación pero; se produce un incremento de los azúcares reductores y por lo tanto un “endulzamiento en frío” del tubérculo. (Burton *et al.*, 1992).

Los tubérculos como tejido vivo está potencialmente para poder brotar, hecho que ocurre cuando se quiebra la dormancia; cada variedad tiene un periodo de dormancia que se caracteriza y este conocimiento es importante para su posible almacenamiento para ver su pérdida de peso y su evapotranspiración. Después de la cosecha, la papa tiene un periodo de dormancia de 2-3 meses. Cuando empieza el brotamiento, los contenidos de almidón y de agua en el tubérculo bajan. Tubérculos en

esta condición no son aceptables ni para el consumo directo ni para procesamiento (Small D. y Pahl K, 2003).

El uso estratégico de diferentes ambientes en la evaluación de la variabilidad genética (Salas *et al.*, 2003) y de herramientas moleculares en los estudios genéticos, constituye un medio valioso para caracterizar y superar asociaciones genéticas indeseables. De aquí, la gran importancia de los estudios de la interacción genotipo por ambiente (GxA) y estabilidad fenotípica en el mejoramiento genético de la papa.

Para entender la formación de azúcares en la papa durante el almacenamiento es necesario conocer su asociación con el nivel de almidón durante la tuberización. Durante éste proceso la glucosa tiene que ser transportada a través del tallo hasta el tubérculo donde se forma almidón por la unión de glucosas. Debido a que la planta no puede transportar glucosa fácilmente, se deben enlazar dos moléculas de glucosa (fructosa) para ser transportadas al tubérculo, donde esta molécula se desdobla nuevamente. (Sowokinos, 2001; Geigenberger, 2003).

Según Woolfe (1987), el rango los azúcares reductores debe ser entre: 0.25 a 0.30% del peso fresco, como concentraciones máximas presentes en los tubérculos de papa para poder ser utilizados en la industria del procesamiento. Dale and Mackay (1994) sugiere que el contenido de azúcares reductores debe de ser 0.1% peso en fresco para fritura en hojuelas, y si sobrepasa los 0.33% es inaceptable.

La cantidad de azúcares en la célula, en equilibrio con la cantidad de almidón, está determinada por la variedad, aunque las condiciones de formación del tubérculo como luz, temperatura, humedad, minerales y tipo de suelo también son importantes. (CIAT, 2002). La tasa de acumulación de los azúcares reductores también está genéticamente determinada, mostrando alta heredabilidad (Colon *et al.*, 1989).

La investigación a nivel genómico ha conducido un aumento rápido de los genes disponibles implicados en metabolismo de carbohidratos de la papa. Se tiene 60

genes de metabolismo de carbohidratos localizados en el mapa genético de papa (Chen *et al.*, 2001).

También se puede comparar genes de otros tubérculos y poder así tener la mayor información comparando mapas genéticos y la mayor atención se centrará en las estructuras que nos dará el banco de genes para ciertas características, en nuestro caso el metabolismo de carbohidratos, esto es necesario para un acercamiento entre tecnología y diversidad (Bonierbale *et al.*, 2003).

### **II.7.1 Fritura en hojuelas y azúcares reductores**

La fritura se considera un proceso de secado ya que el agua interna migra desde la parte central hacia las paredes o superficies para reemplazar a la que se va perdiendo por deshidratación del exterior de las superficies.

Hoover y Xander (1961), encontraron que algunas otras sustancias como el ácido ascórbico, los aminoácidos básicos, y los sistemas de enzimas específicos pueden estar relacionados como el color de la hojuela. Los azúcares reductores más frecuentes en la papa son: Sacarosa, Fructuosa y Glucosa.

Burton (1966), dice que en los tubérculos maduros almacenados, los azúcares y almidones están en un estado de equilibrio dinámico. En tubérculos cosechados entre 10°C a 20°C, el 98% de los carbohidratos están en equilibrio, en forma de almidón, pero la respiración causa cambios en los constituyentes de los tubérculos y sus equilibrios están sujetos a cambios durante el almacenamiento. El contenido de azúcares se incrementa por debajo de los 5°C.

Burton (1972), estudió los procesos relacionados con el endulzamiento almacenados entre 2°C y 10°C de algunas variedades y las relacionó con los niveles de azúcares solubles (sacarosa, glucosa y fructuosa) y el problema del envejecimiento.

Verma (1972), relacionó los azúcares solubles con el estado de maduración de los tubérculos. Menor concentración de los azúcares solubles se produce en tubérculos maduros. Si estos se almacenan a bajas temperaturas contienen más azúcares reductores.

Burton (1978), dice que el mecanismo del endulzamiento de la papa cuando se almacena a baja temperatura, puede ser explicado en términos de la actividad relativa de enzimas y enzimas inhibidoras. La Fosforilasa rompe el almidón a glucosa-1-fosfato.

Algunos de estos son convertidos a Sacarosa por la Sintetasa fosfato sucrosa, subsecuentemente la hidrólisis de Sacarosa a glucosa y fructuosa es regulada por los niveles comparativos de B-fructo-furunosidasa (invertasa) y un B-fructo-furosidasa como inhibidor. La importancia de estas enzimas en el proceso industrial es que causan decoloración o ennegrecimiento de los tubérculos cortados o pelados, hay otros factores que afectan la susceptibilidad de la papa a la decoloración enzimática tales como variedad, clima, y prácticas culturales.

Un fenómeno muy importante que influye en la calidad de las papas procesadas en el pardeamiento y se clasifican en dos: No Enzimáticos y Enzimáticos. El primero es quizás el mas importante ya que hay una reacción entre los azúcares reductores y los aminoácidos libres presentes en la papa y se conoce como “Reacción de Maillard”, que es causante de la coloración que presenta las hojuelas elaborados (Goud, 1999).

Probablemente el problema más importante para la industria de las papas en hojuelas es el mantener un buen color en el proceso de fritura y esto es determinado por la composición química del tubérculo de papa y este a su vez el balance químico de los tubérculos según su variedad, tipo de suelos, clima, y condiciones de cultivo, ya que algunas variedades se comportan bien almacenadas al frío. (Talburt y Smith, 1975).

En alimentos con alta concentración de azúcares reductores y lisina es donde tiene mayor efecto la reacción de Maillard dando melanoidinas coloreadas. En ocasiones, sus efectos pueden ser indeseables en algunos alimentos porque no sólo producen colores y olores desagradables, sino que pueden producir compuestos tóxicos (Badui, 1999). En caso de hojuelas la interacción de azúcares reductores y aminoácidos libres produce las melanoidinas, que son productos de distintos colores: beige, pardo, negruzco y negro (Badui, 1999).

La reacción de Maillard ocurre más rápidamente si hay monosacáridos libres que si hay disacáridos. Además esta reacción ocurre con mayor rapidez si los carbohidratos son aldosas que si son cetosas y si son pentosas reaccionan más rápido que si son hexosas. En las etapas iniciales de la reacción ocurren más rápidamente con fructosa que con glucosa. Como resultado se da lugar a una disminución de la calidad de proteína debido a la pérdida de residuos del aminoácido y digestión de la proteína (Dills, 1993).

El oscurecimiento o pardeamiento enzimático ("enzymatic browning") constituye uno de los principales problemas durante el procesamiento de tubérculos. Paralelamente con la alteración del calor, se producen cambios en el sabor y pérdidas apreciables del valor nutricional de estos alimentos. Este proceso indeseable es debido a la oxidación de compuestos fenólicos, en reacción catalizada por la enzima Polifenol oxidasa (PFO) (o-difenol: 02 oxidoreductasa. EC 1.10.3.1). Otros nombres dados a esta enzima son los de fenolasa, fenol oxidasa, tirosinasa, catecolasa, oxidasa del ácido clorogénico, etc. (Raupp, 2002).

Hesen (1991) menciona que los productos procesados de papa deben de tener una buena calidad, la industria procesadora requiere papas con alta cantidad de materia seca y bajo contenido de azúcares reductores.

Hesen (1976), dice que los aminoácidos reaccionan con los azúcares reductores por lo que el producto adquiere un color negruzco y con un sabor

amargo esto en hojuelas, por lo que recomienda un máximo de azúcares reductores de 0.3% del peso en fresco y un almacenamiento de 8°C a 10°C para reducir el mínimo de contenido de azúcares reductores.

Love *et al.*, (1998) estudio el efecto de 44 cultivares para el procesamiento en hojuelas, almacenadas a temperatura de 10°C y a 4.4°C durante 3 meses de almacenamiento con un periodo de reacondicionamiento 15°C a 18°C antes de ser evaluadas en procesamiento fritura y azúcares reductores, obtuvo que los niveles de azúcares reductores se elevaron muy poco sobre todo guardados a 10°C, se obtuvieron las hojuelas de calidad ya que estos cultivares eran genéticamente mejorados para hojuelas. La conclusión sería que cultivares guardados a 4°C incrementan sus azúcares reductores mas que a temperatura ambiente.

Marwaha (1998), obtiene resultados óptimos en diferentes estadios de crecimiento de la planta y determina los parámetros óptimos para: los azúcares reductores, gravedad específica, materia seca y considerara ese estadio de la planta como la base para determinar la madurez óptima de las papas para el procesamiento.

Se puede decir que la performance del color de los chips se debe a la interacción que ocurre durante el crecimiento y la post cosecha, encontró una correlación alta entre azúcares y el color de los chips (Sinha *et al.*, 1992).

Se han identificado cultivares nativos relativamente estables, tanto en contenido de materia seca, así como en oscurecimiento de hojuelas fritas de tubérculos almacenados, incluso en frío (4°C) (Amorós *et al.*, 2000). Dándonos una pauta para su posible industrialización, ya que el problema más frecuente para la industria es el mantener un color constante y característico de las hojuelas de papa.

## **II.8 Calidad del producto**

En general podríamos decir que la calidad de los productos procesados en hojuelas está dada principalmente por la acumulación de los azúcares reductores (Pereira *et al.*, 1992) y los sólidos totales (Kleinschmidt *et al.*, 1984). Para una buena calidad de producto procesado en hojuelas tienen que tener características muy buenas en:

### **II.8.1 Color de Hojuela**

Este es un factor preponderante, estos colores varían entre: blanco, amarillo y crema, que son los más preferidos.

Lisinska y Leszczyńska (1989), mencionan que el color de los chips de papa, es el resultado de la caramelización de los azúcares por la Reacción de Maillard.

Los cultivares nativos aptos para el procesamiento presentan colores secundarios diversos y se debe a la antocianina, pigmento que va a dar colores diversos como: azul, púrpura, violeta, magenta y todos los tonos del rojo y rosado (Bonierbale, 2000), además son antioxidantes naturales presentes en cantidades superiores a cualquier variedad mejorada. Huamán (1986), describe al color secundario como manchas dispersas, anillos vasculares (angosto, ancho y no presenta en la médula)

### **II.8.2 Sabor**

El sabor en hojuelas es quizás uno de las características más importantes para el consumidor. Importantes factores influyen como el aroma, textura y el gusto de uno (Dale y Mackay, 1994).



Las papas de diferentes variedades o de diferentes edades, contienen diferentes niveles de componentes bioquímicas; y lo que se espera es que tengan diferentes aromas (Self *et al.*, 1964). Los azúcares reductores y el contenido de almidón son los componentes más importantes para el sabor de las hojuelas (Lisinska, y Leszczynski, 1989).

### **II.8.3 Textura**

Se menciona que la textura en la papa esta relacionada con el contenido de materia seca. Papas con contenido de materia seca alta mas de 25% presentan texturas duras, crocantes y con materia seca baja sus textura es blanda y que la textura se relaciona con el contenido de almidón teniendo, una correlación positiva entre harinosidad y sólidos totales. (Holden, 1981).

### **II.8.4 Absorción de aceite**

Esta íntimamente relacionado con el contenido de materia seca o sólidos totales, esto indica que a mayor cantidad de materia seca la absorción de aceite será menor, es decir que es inversamente proporcional (Guld, 1989; Sorey y Davies, 1992; Lulai y Orr, 1979).

## **II.9 Reacondicionamiento**

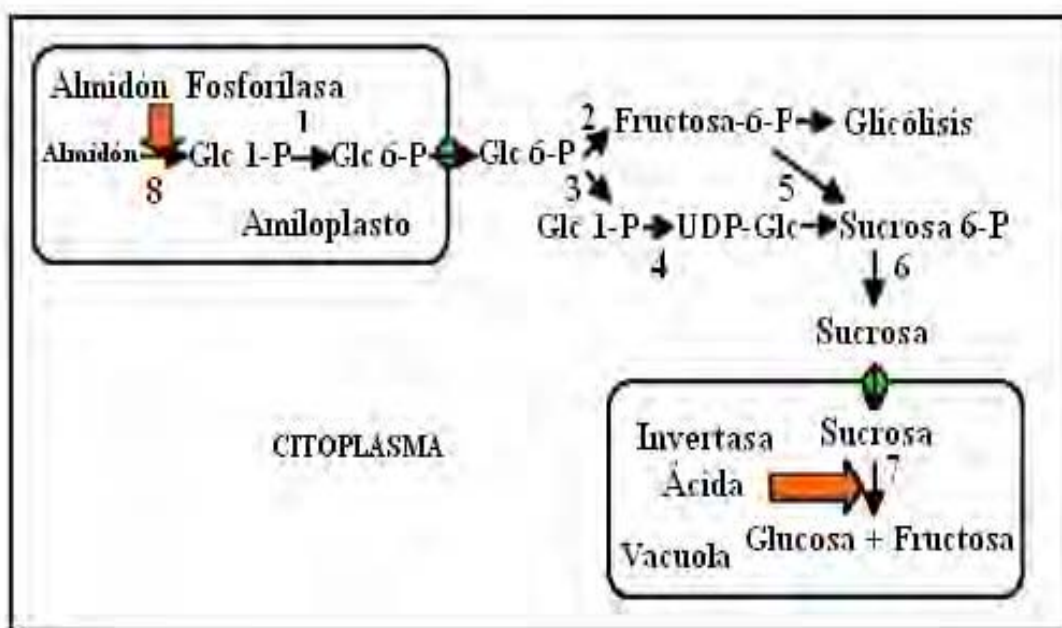
El endulzamiento en frío de los tubérculos de papa, pueden ser revertidos por reacondicionamiento.

Isherwood (1976), observó la interconversión entre azúcar-almidón. En tubérculos maduros almacenados en frío a 2°C primero se acumuló sacarosa cuando fueron colocadas a 10°C para reacondicionamiento para luego convertirse en almidón.

Reacondicionar es decir poner de nuevo a temperatura ambiente las patatas previamente almacenadas en frío se utiliza a menudo para reducir el contenido del azúcar antes del procesado. Y que aproximadamente el 80% de azúcares de reducción son convertidos de nuevo al almidón, y que los 20% restantes están perdidos con la respiración o para otras aplicaciones (Burton *et al*, 1992)

Sowokinos (2001), los tubérculos crecientes de la papa se han utilizado como un sistema modelo para investigar la regulación de la síntesis del almidón. Los resultados indican que la degradación de la sucrosa y la síntesis del almidón son controladas vía señales reguladoras en respuesta a disponibilidad de la sucrosa y del oxígeno. Desarrolla el siguiente modelo (Figura II.3)

Puesto que la dulcificación fría y el reacondicionar son procesos complejos, es difícil determinar los cambios bioquímicos y sus regulaciones moleculares. Los análisis genéticos fisiológicos, y moleculares bioquímicos, moleculares comparativos de diversos cultivares de la patata, incluyendo cultivares sensibles al frío y resistentes al frío, podían ser una herramienta de gran alcance para facilitar el descubrimiento de los factores que regulaban la acumulación de azúcares en el frío. Varias enzimas en el camino metabólico se deben analizar, especialmente las enzimas en ambos finales del camino metabólico que va desde azúcar a almidón. (Chan-Ai Xu, 2004)

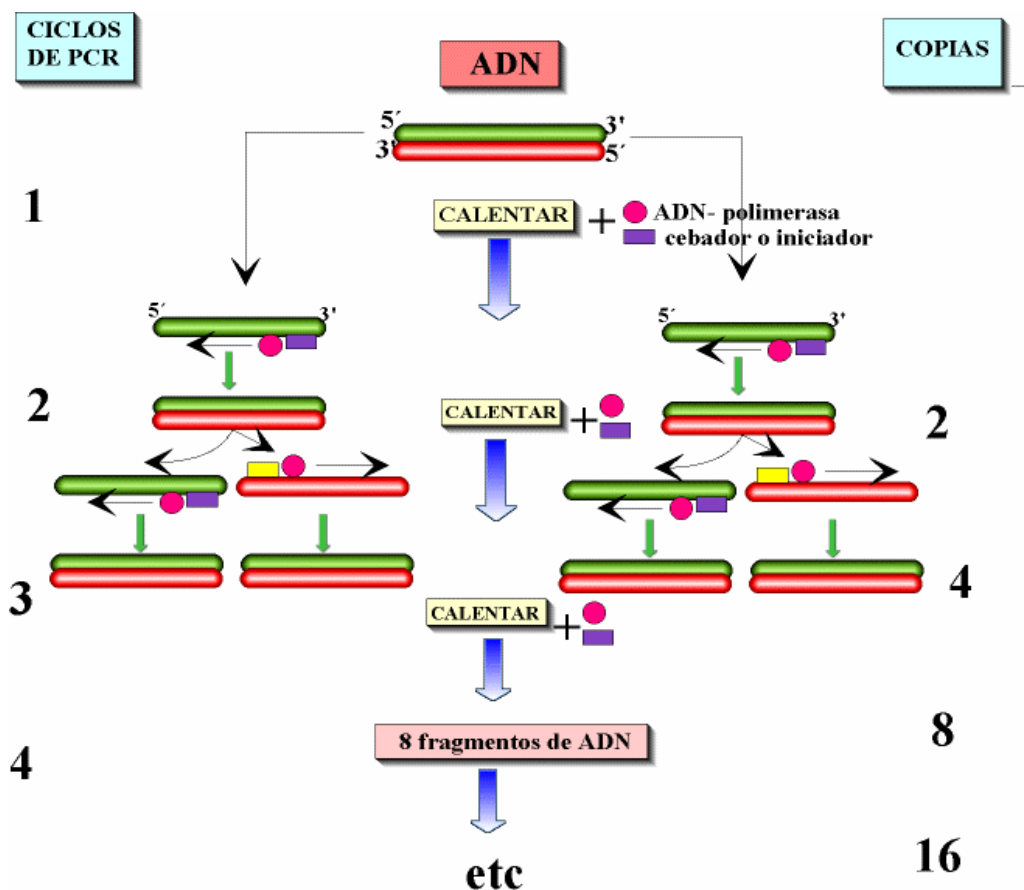


**Figura II.3** Esquema de la degradación de sucrosa y síntesis y del almidon donde: 1.- Fosfoglutamasa plastidial, 2.- Fosfohexosa isomerasa, 3. Fosfoglutamasa citosolica, 4.- UDG- pirofosforilasa, 5.- Sucrosa-6-fosfato sintetasa, 6.- Sucrosa-6-fosfato fosfatasa, 7.- Invertasa ácida, 8.- Almidón fosforilasa.

La biotecnología esta apoyando mucho al mejoramiento de papa con técnicas de multiplicación rápida. La biología molecular ofrece herramientas nuevas para estudiar o modificar procesos metabólicos como por ejemplo, defensa de la planta frente a patógenos, estrés abiótico, calidad post cosecha y otros, además nos permite a aprovechar datos de información genotípica. El mapeo con marcadores genéticos de ADN permite ubicar efectos genéticos dentro y entre cromosomas. (Bonierbale *et al.*, 2000).

## II.10 Reacción de la Cadena Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés, es una técnica (Mullis y Faloona, 1987) de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de una pequeña copia de ese fragmento. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Para ello son necesarios la existencia de los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina, y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebador (Figura II.4).



**Figura II.4** Reacción en cadena de la polimerasa PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla en tres pasos: El primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, para lo cual se debe calentar el ADN a altas temperaturas que pueden ser próximas a la ebullición. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria. A continuación se baja la temperatura para conseguir que cada cebador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN. El último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa. El problema con el que se encontraron los científicos que idearon esta técnica, es que es preciso aumentar la temperatura de la mezcla de reacción hasta valores por encima de los 70°C para que las dos cadenas de ADN se separen. A éstas temperaturas tan elevadas la ADN polimerasa se inactivaba y era preciso añadirla de nuevo en cada ciclo. Esto fue así hasta que se descubrió la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en aguas termales y cuya ADN polimerasa (Taq polimerasa) es capaz de trabajar a temperaturas superiores a los 70°C. De esta manera sólo hay que añadir la enzima al inicio del proceso de reacción y llevar a cabo tantos ciclos que sea necesario. Cada una de las moléculas de ADN hijas pueden volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias. Así tras 20 ciclos de reacción se puede obtener hasta 1 millón de copias de una molécula de ADN.

## **II.11 Marcadores Moleculares**

Las nuevas técnicas de biología molecular, permitieron diversos métodos de polimorfismo genético en el ADN. Inicialmente, la utilización de enzimas de restricción permitió el análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del ADN que es el RFLP mas recientemente, el desarrollo del proceso de amplificación de la cadena utilizando una ADN polimerasa- PCR (Mullis y Faloona, 1987; Saiky *et al.*, 1988). Y llevó al inicio de otros tipos de marcadores moleculares y aliadas a la técnica de clonación y secuenciamiento del ADN, han posibilitado obtener y acumular gran número de información sobre el genoma., Hoy en día mediante esto se

puede obtener un gran numero ilimitado de marcadores moleculares altamente polimórficos.

Hay muchas ventajas sobre marcadores moleculares sobre los marcadores morfológicos: el alto nivel polimórfico, no son influidos por el medio ambiente, son neutros, son codominantes en su gran mayoría, contienen mayor información genética por locus, no se requiere que la planta esta adulta, se puede identificar en cualquier estadio de la planta, desde de tejidos o células (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Hoy en día existen muchas técnicas moleculares utilizadas para la información molecular, sobre todo para diversidad genética entre estas tenemos:

## **II.12 Técnicas basadas en la hibridación**

RFLP Restriction Fragment Length Polimorphism hace referencia al polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, este es evidenciado por la fragmentación del ADN mediante enzimas de restricción y observadas con la hibridación de estos fragmentos con secuencias homólogas de ADN marcadas con radioactividad o compuestos que desencadenan una reacción de luminiscencia. El corte de ADN genómico por parte de una endonucleasa de restricción genera una serie de fragmentos cuya longitud está dictada por el reconocimiento de la secuencia de nucleótidos que conforman la diana. Los cambios nucleotídicos que afectan las dianas, permiten detectar el polimorfismo entre dos individuos. Este polimorfismo se evidencia por migración del ADN fragmentado en un soporte físico sometido a un campo eléctrico. El uso de los RFLP en plantas representa una buena alternativa para realizar diversos estudios relacionados con los tres genomas que existen en ellas, el nuclear (ADNn), mitocondrial (ADNmt) y el de cloroplasto (ADNcp).

La aplicación de esta técnica ha sido de gran utilidad en estudios filogenéticos, diversidad genética (Becerra y Gepts, 1994) e identificación de cultivares con propósitos de protección varietal.

## **II.13 Marcadores Basados en PCR**

Reacción en cadena de la Polimerasa concebida por Kary Mullis en la década de los 80 (Mullis y Falloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985). Esta técnica con la facilidad, rapidez, versatilidad y sensibilidad de la PCR, se torna particularmente poderosa, para estudios genético-moleculares que influyen gran número de individuos de cualquier organismo vivo.

Un gran avance en el área de marcadores moleculares basados en PCR ocurrió en 1990, con la idea de utilizar “primers” más cortos y de secuencia arbitraria para dirigir la reacción de amplificación.

### **II.13.1 Técnicas basadas en PCR que usan iniciadores arbitrarios**

RAPD.- “Random Amplified Polimorphic DNA” o ADN polimórfico amplificado al azar, donde los iniciadores sintéticos son escogidos arbitrariamente resultando la amplificación de varios productos anónimos de DNA (Karp *et al.*, 1997). De esta forma, se genera un patrón de bandas sencillo que dependerá de la capacidad del cebador para encontrar zonas parciales o totalmente complementarias que puedan acotar en ambos sentidos una secuencia corta. En función de la secuencia nucleotídica, la amplificación evidenciará el polimorfismo existente entre dos individuos, dando lugar o no a determinadas bandas.

Los productos de la amplificación son separados mediante electroforesis y las bandas visualizadas, de diferentes pesos moleculares representan diferentes loci. Las principales ventajas de esta técnica son la rapidez en la obtención de resultados, el costo, el no uso de radioactividad, menor inversión en equipos y la cantidad reducida de ADN requerida. Sin embargo como desventaja aparece la inconsistencia de los datos. Diferentes condiciones de laboratorios con pequeñas

alteraciones en los parámetros de amplificación, pueden dar origen a resultados diferentes.

AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism), o polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados, representa una tecnología donde nos da un gran número de marcadores moleculares dentro del genoma de plantas y animales; se combina la digestión de enzimas de restricción y con la velocidad y practicidad del PCR. (Karp *et al.*, 1997; Van Eck *et al.*, 1995; Vos *et al.*, 1995). Con esta técnica se puede detectar una variación considerable del genoma, lo cual se refleja en el número de productos amplificados con una sola combinación de partidores. La eficiencia en detectar polimorfismo puede ser varias veces mayor que la obtenida con RAPD y RFLP.

Una de las mayores ventajas de esta técnica es que en una sola reacción se puede identificar alrededor de 50 loci en un tiempo corto (Tohme *et al.*, 1996).

Una de las desventajas para la interpretación de los datos es el tiempo necesario para el análisis cuando se realiza en forma no automatizada (visual). Por otro lado, los loci de AFLP son tan reproducibles como los RFLPs, pues son prácticamente insensibles a las condiciones de la reacción (Tohme *et al.*, 1996), aunque ambas técnicas requieren de una buena calidad de ADN para el proceso de digestión con enzimas de restricción.

Comparativamente, estas dos técnicas son de mayor precisión que los RAPDs, susceptibles a una falta de estandarización del proceso de amplificación.



## **II.13.2 Técnicas basadas en PCR de secuencia específica**

### **II.13.2.1 Microsatélites**

Los microsatélites o SSRs, iniciales de su nombre en inglés (Simple Sequence Repeats), son secuencias cortas de ADN, de 1 a 6 nucleótidos, repetidas cierto número de veces y que se encuentran esparcidos por todo el genoma de los organismos eucariontes (Tautz, 1989) y procariontes (Zane *et al.*, 2002). Los microsatélites se llamaron primero VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) porque la unidad repetible estaba presente un número variable de veces. El término VNTR también incluía los minisatélites cuya unidad de repetición es más larga (de 100 a varios cientos de nucleótidos). La nomenclatura terminó dejando el término microsatélite o STR (Short Tandem Repeat) para los más cortos, y minisatélites o VNTR para los otros.

Los SSRs son conocidos como microsatélites, se encontraron en abundancia en el genoma de la papa. Las secuencias microsatélites están presentes en todas las células eucariotas y se ubican en loci específicos densamente distribuidos sobre los genomas, tanto en regiones codificantes como no codificantes (Cardle *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1994)

Estudios demostraron el interesante hecho de que la distribución y frecuencia de los microsatélites son diferentes dentro de los grupos taxonómicos. El genoma de las plantas contienen aproximadamente diez veces menos microsatélites que los animales (Powell *et al.*, 1994; Gupta y Varshney, 2000). En plantas el motivo que más se repite es AT; es decir es el más frecuente; en humanos y animales, el motivo GT es el más frecuente (Powell *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994).

Cuando estas regiones son individualmente amplificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un par de oligonucleótidos

flanqueantes como iniciadores, muestran casi invariablemente polimorfismo debido a las diferencias en su longitud, como consecuencia de la ocurrencia de los diferentes números de las unidades de repetición o motivos (Morgante y Olivieri, 1993).

La eficacia de los marcadores SSR para los análisis genéticos ha sido demostrada suficientemente (Morgante y Olivieri, 1993). Los loci SSR son abundantes y están dispersos a lo largo de los genomas eucarióticos, incluyendo los orgánulos citoplásmicos (Tautz *et al.*, 1986; Tautz, 1993). Sin embargo, uno de los mayores inconvenientes asociados con el desarrollo de marcadores microsatélites es el tiempo inicial y la cantidad de recursos que se requieren para construir, seleccionar y secuenciar las bibliotecas genómicas o de ADNc. Para aliviar éste problema, muchos de los estudios iniciales de microsatélites en humanos, animales y plantas fueron llevados a cabo usando secuencias obtenidas de bases de datos públicas, tales como EMBL y GenBank. (Provan *et al.*, 1996). Con la enorme cantidad de datos de secuencias de todas las especies que están creciendo a una gran velocidad, las bases de secuencias son una fuente muy útil para el desarrollo de marcadores SSR. El uso de microsatélites ha ido aumentando mediante la producción de bibliotecas de iniciadores o primers y la secuenciación automática fluorescente que permiten el diseño de los iniciadores que rodean los microsatélites (Brondani *et al.*, 1998).

Con ayuda del programa PRIMER3, VECTOR , etc. accesibles en la web. Los fragmentos generados son separados en geles denaturantes de poliacrilamida y visualizados radiactivamente o por tinción con nitrato de plata.

Las secuencias microsatélites nucleares son altamente inestables, presentando una de las más altas tasas de mutación observadas en marcadores moleculares (Goldstein, 1997). La misma varía entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  por generación (Macaubas *et al.*, 1997). Los patrones de mutación observados parecen corresponderse bien con un modelo de pequeños cambios en las unidades de

repetición, vía un mecanismo de patinaje de las hebras (“strand-slippage”) durante el proceso de extensión (Levinson y Gutman, 1987; Strand *et al.*, 1993; Schlötterer y Tautz, 1992). Dicho patinaje provoca la formación de un lazo del tamaño de una o varias secuencias de repetición. En general, la amplificación de microsatélites ha demostrado que éstos son más variables que isoenzimas, RFLP, AFLP y RAPD.

El número de microsatélites ha mostrado alta variabilidad dentro y entre especies y sub especies. Por su alta tasa de mutación constituye el marcador molecular con más alto contenido de información polimórfica (PIC). Esta característica hace que sus aplicaciones sean en muchos campos como marcador molecular y podemos aplicarlo en: “Fingerprinting” (Wesing *et al.*, 1995; Diwan y Cregan, 1997; Ashikawa *et al.*, 1999), mapeo genético (Broun y Taksley, 1996; McCouch *et al.*, 1997; Roder *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000). Filogenética (Goldstein y Pollock, 1997), mejoramiento genético asistido y genético de poblaciones (Goldstein *et al.*, 1999).

Su alto contenido del PIC bien representado dentro de los genomas de los eucariontes, los microsatélites como marcador molecular tienen especiales características que los hacen factibles a ser usados por su herencia codominante, fácil escoreo de los alelos, reproducibilidad y accesible a los laboratorios ya que no se requiere de equipos altamente sofisticados, estas características ha animado fuertemente al desarrollo de los microsatélites y en diferentes especies tales como: *Glycine max* “soya”(Akkaya *et al.*, 1995; Morgante y Olivieri 1994; Rongwen *et al.*, 1995; Maughan *et al.*, 1995; Cregan *et al.*, 1999; Song *et al.*, 1999), *Oriza sativa* “arroz”(Wu y Tasley, 1993, Akagi *et al.*, 1996), *Zea maiz* “maiz” (Senior y Heum, 1995), *Vitis vinifera* “uva” (Thomas y Scott,1993), *Arabidopsis thaliana* (Bell y Ecker, 1994), *Triticum aestivium* “Trigo” (Roder *et al.*, 1995), *Phaseolus vulgaris* “haba” (Yu *et al.*, 1999), *Lactusa sativa* L “lechuga” (Van de Wiel *et al.*, 1999), *Pinus strobes* “pino” (Echt *et al.*, 1996), *Hordeum vulgare* “cebada” (Liu *et al.*, 1996), *Lycopersicum esculentum* “tomate”

(Areshchenkova y Ganal, 1999) hicieron el primer reporte de SSRs en papa basado en secuencias de ADN para una base de datos pública. Milbourne *et al.*, (1997), reportaron 75 entradas del genero *Solanum*, construyendo librerías genómicas en papa basado en microsatélites poniéndolas disponibles para el GenBank.

### II.13.2.2 Clasificación de los Microsatélites

Según Jarne y Lagoda (1996), los microsatélites se pueden clasificar en familias:

1.- Puros o perfectos	CACACACACACACACACACA
2.- Compuestos	CACACACACAGAGAGAGAGA
3.- Interrumpidos	CACATTCACACATTCATTCA

Chambers y MacAvoy (2000), dan a conocer un tipo de nomenclatura para los microsatelites, recomendando usar la regla del orden alfabético. También propone el término puro (o perfecto), compuesto y complejo y lo usa para especificar que uno, dos o más tipos de motivos respectivamente a lo largo de un locus microsatélite dado, y que el término interrumpido (o imperfecto) como un descriptor jerárquico adicional que indica que hay uno o más unidades no repetitivas en el interior de los microsatélites. Y propone seis clases de Microsatélites:

Tipo de Microsatélite	Secuencia
SSR Puro	--(AC) <sub>14</sub> --
SSR Interrumpido puro	-TA-(CA) <sub>4</sub> - TA--CA) <sub>4</sub> ---
SSR Compuesto	-(CT) <sub>22</sub> -(CA) <sub>6</sub> ---
SSR Interrumpido compuesto	-(AC) <sub>14</sub> —AG—AA—(AG) <sub>12</sub> —
SSR Complejo	(ACC) <sub>8</sub> —TG—(GA) <sub>12</sub> —(TTA) <sub>5</sub> —GC—(TTA) <sub>4</sub>
SSR Interrumpido complejo	—(TTA) <sub>4+3</sub> -TA-(CA) <sub>4</sub> - TA--CA) <sub>4</sub> ---

### **II.13.2.3 Ventajas de los marcadores Microsatélites**

Si tenemos en cuenta la expresión codominante y el multialelismo, los SSR son los que poseen el más elevado contenido en la información de Polimorfismo, o “PIC” (“Polymorphism Information Content”), donde de todos los marcadores moleculares. Por esa razón toda población segregante pueden ser utilizadas como población de referencia para estudios de ligamiento y mapeo genético, para seleccionar la población más informativa desde el punto de vista de las características biológicas o económicas de interés. Son muy frecuentes y están distribuidas al azar, y permite así la más completa cobertura del genoma. Y estos sitios están bien conservados entre especies relacionadas, la cual permite la transferencia de marcadores entre especies, haciéndolos ideales para el mapeo genético y discriminación de genotipos y en estudio de genética de poblaciones (Ferreira y Gatappaglia, 1998)

Es una técnica sensible: sólo pequeñas cantidades de ADN son requeridas, son muy abundantes: los microsatélites, están uniformemente dispersos a través del genoma, aproximadamente cada 10 Kbp. De fácil intercambio de datos entre laboratorios: la información puede ser comunicada por la simple secuencia de los iniciadores, sin la necesidad de la transferencia física de los iniciadores (Powell *et al.*, 1996)

El polimorfismo de los SSRs esta basado en la variación del número de motivos repetidos y es detectado por electroforesis de los productos amplificados por PCR (Saiki *et al.*, 1988)

### **II.13.2.4 Aplicaciones de los microsatélites**

Los marcadores moleculares se han empleado en el género *Solanum* para el análisis de la biodiversidad y para estudios filogenéticos. Fragmentos

específicos permiten hacer un seguimiento de introgresiones de especies silvestres en variedades de papa (Gorg *et al.*, 1992).

Ghislain *et al.* (2000), caracterizaron la colección de papa (*Solanum* spp.) en el CIP con marcadores moleculares para aminorar las redundancias genéticas e identificar accesiones importantes para la conservación y el mejoramiento del cultivo. Más de 70 marcadores del microsatélite fueron probados en una muestra genética diversa del germoplasma de papa. Seleccionaron un subconjunto de los 18 microsatélites más informativos según la calidad de los productos del ADN que amplifican, de su localización del genoma, y del nivel del polimorfismo que presentan. Estos análisis han demostrado que los microsatélites seleccionados son ubicados en las ocho especies cultivadas de la papa. El kit utilizado PGI (Genetic identification), también se ha demostrado que es útil para distinguir variedades y cultivares de la papa.

#### **II.13.2.5 Limitaciones de los SSR**

Dentro de las limitaciones de los microsatélites se da en el trabajo previo ya que se necesita cierta práctica para hacer el clonamiento y secuenciamiento de los loci SSR, exigiendo personal especializado y equipamiento necesario (Ferreira y Gatappaglia, 1998), también el costo involucrado en el proceso del diseño de cada iniciador, sin embargo existe la posibilidad de usar los mismos iniciador en más de una especie. Esto es debido, a que existe un grado de conservación de los microsatélites entre genomas de especies tan distantes como son algunos mamíferos, plantas anuales y perennes. Esto no es generalizado en todas las especies, puesto que al comparar entre cereales de grano pequeño como: trigo, cebada y centeno, se ha detectado una limitada conservación de las secuencias microsatélites.

Por otro lado, tenemos la aparición de alelos nulos o la presencia de alelos de bandas “tartamudas”, que se podría dar en el caso que mutaciones puntuales, ocurridas en el sitio de apareamiento de los iniciadores. Las bandas tartamudas son productos de la amplificación por PCR que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original. La ocurrencia de estas bandas dificultan la lectura de los geles, e inclusive, y son confundidos como alelos, complicando el análisis posterior. Por la tanto la interpretación de los tamaños de los alelos se haga con dificultad. Esto probablemente se da por equivocación de la Taq polimerasa durante el proceso de replicación.

Estudios habían demostrado la relación existente entre la frecuencia del microsatélite y la del tamaño del genoma de la planta, obteniendo una correlación positiva (Kubis *et al.*, 1998., Field y Wills, 1998., Primer *et al.*, 1997). Aunque la frecuencia de las regiones de ADN del microsatélite aumenta generalmente con el aumento de tamaño del genoma, el tamaño del genoma tiene un efecto negativo en la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Así, los investigadores que desarrollan sistemas de plantillas PCR, como se hace comúnmente para las regiones del ADN del microsatélite, pueden encontrar mayor dificultad al trabajar con las especies que tienen genomas más grandes (Garner, 2002), pero las frecuencias de diversos tipos de microsatellites varían extensamente entre los taxa y los tipos cromosómicos (Hancock, 1999; Field y Wills, 1998).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1 Materiales

##### III.1.1 Material biológico

El material biológico que vamos a estudiar fue fruto de un periodo de selección de 345 cultivares previamente seleccionados por pulpa amarilla y/o pigmentada que se viene realizando desde el 2001 en el Centro Internacional de la Papa. Se evaluó el contenido de materia seca y fritura en hojuelas es decir el grado de oscurecimiento en tres tratamientos: 10 días después de la cosecha, 90 días almacenamiento (CA), 4 ° C y 90 días almacenamiento ambiente (CF); de aquí se escogieron 25 variedades muy buenas en fritura de hojuelas en los tres tratamientos y 15 muy malas respectivamente (Tabla III.1)

**Tabla III.1** Cuarenta cultivares nativos de papa usados en el experimento.

Cipnumber	Spp	Ploidía	Name	Origen
701014	Juz	3x	Huataqui	PER
701014	Juz	3x	Huataqui	PER
701131	Adg	4x	Ñata	PER
701165	Stn	2x	Calhua Rosada	PER
701273	Adg	4x	Muro Shocco	PER
701633	Stn	2x	Pirampo	PER
701862	Gon	2x	Amarilla Tumbay	PER
701940	Adg	4x	Coletto	PER
701941	Adg	4x	Higos	PER
702363	Adg	4x	Socco Huaccoto	PER
702477	Adg	4x	Yana Puma Maqui	PER
702915	Adg	4x	Puca Trombos	PER
702937	Cur	5x	Laram Ocucuri	PER
703168	Gon	2x	Puca Pishgush	PER
703257	Adg	4x	Chola	ECU
703269	Adg	4x	Chaucha Roja	COL
703279	Gon	2x	Unknown	PER
703287	Stn	2x	Cceccorani	PER
703314	Stn	2x	Yana Turuna	PER
703421	Stn	2x	Poluya	BOL



<b>Cipnumber</b>	<b>Spp</b>	<b>Ploidía</b>	<b>Name</b>	<b>Origen</b>
703445	Stn	2x	Uchu Caspa	PER
703488	Adg	4x	Challina	PER
703698	Stn	2x	Capacho Azul	PER
703768	GxS	2x	Huayro Roja	PER
703777	Gon	2x	Shumajperga	PER
703787	Adg	4x	Negritas	PER
703825	Gon	2x	China Runtush	PER
703831	Gon	2x	Pampuna	PER
703844	Stn	2x	Añil Papa	PER
703978	Stn	2x	Kellu Chojllu	PER
704022	Stn	2x	Kellu Suito	PER
704143	Adg	2x	Negra Ojosa	ARG
704327	Cha	3x	Color Unckuna	PER
704356	Adg	4x	Kuchipa Akan	PER
704393	Gon	2x	Maria Cruz	PER
704481	Gon	2x	Amarilla	PER
705280	Adg	4x	Muringuilla	ECU
705543	Cha	3x	Yana Warmi	PER
706134	Stn	2x	Cceccorani	PER
706346	Adg	4x	Unknown	PER
706819	Adg	4x	Tablera Jubale±a	ECU

### III.1.2 Material de laboratorio

- Beakers PYREX®, volúmenes de 100, 150, y 500 ml
- Beaker de Plástico, volumen de 4000 ml (Nalgene)
- Bandejas de plástico y metal
- Bombilla.
- Bureta 25ml
- Cajas de dilución para 96 muestras (1 ml de capacidad c/u, Beckman)
- Cajas de tecnopor
- Cinta adhesiva
- Combitips Eppendorf de 50 µl, y 2.5 ml
- Embudos de plástico y de vidrio
- Erlenmeyers PYREX®, volúmenes de 250, 500, 1000, y 2000 ml

- Espátula de metal
- Espaciadores de 0.4 mm
- Fiolas 100, 250, 500, 1000ml
- Grasa silicona DOWCORNING®
- Gradillas
- Guantes de vinil (Dura Touch™, Ansell Edmont Industrial)
- Jeringas descartables, volumen 10 ml
- Magnetos (Fisher Scientific)
- Matraz Erlenmeyer 250, 500, 1000 ml.
- Matraz Kitazato, volumen 1000 ml (PYREX®)
- Moldes de acrílico para preparación de geles de agarosa
- Morteros y pilones de porcelana (Corn)
- Papel aluminio
- Papel filtro Whatman 4
- Papel fotográfico APC film Kodak®
- Papel Kimwipes® (Kimberly Clark Corporation)
- Papel toalla.
- Peines para geles de agarosa y acrilamida
- Pinzas metálicas
- Placas de policarbonato de 96 pocillos para PCR (MJ Research)
- Plumones marcadores de tinta indeleble
- Probetas de vidrio y plástico, volúmenes de 50, 100, 250, y 500 ml; 1 y 2 L (Nalgene)
- Placas de vidrio para electroforesis vertical
- Puntas plásticas de 2.5, 10, 200, y 1000 µl de capacidad (Daigger, Sigma, Oxford y Fisher)
- Puntas plásticas cortadas de 200 µl de capacidad (Sigma)
- Repetitivo Eppendorf
- Saran Wrap™ (Dow Chemical Company Indianapolis, Ind.)
- Soporte Universal
- Tapers de plástico

- Termómetro
- Tijeras
- Tubos de centrífuga 50 ml falcon (Corning)
- Tubos para microcentrífuga eppendorf de 2.0, 1.7 y 0.6 ml de capacidad (Sigma)
- Vasos de precipitación 50, 100, 250, 500, ml

### **III.1.3 Equipos de laboratorio**

- Agitador magnético (Fisher Scientific)
- Agitador Vortex-2, Genie Scientific Industries INC.
- Autoclave (Market forge, Everett Mass)
- Balanza analítica (OHAUS®, modelo GA110)
- Balanza de Precision, AB204, Metler Toledo 10mg-250g +/-1mg
- Baño María (Precision scientific, modelo 188)
- Bomba de vacío (GAST)
- Calentador /agitador magnético, Cole Parmer Instrument Company Magne 4''.
- Cámara de luz blanca
- Cámara Flujo Laminar, EACI Enviromental air control inc.
- Cámaras para electroforesis horizontal: BIO-RAD; Life technologies™ Gibco BRL, modelo H4.
- Cámaras para electroforesis vertical: Life technologies™ Gibco BRL, modelo S2
- Campana extractora de gases (Metálica)
- Computadora PC compatible
- Congeladores de -20°C y -70°C
- Destilador (Wheaton instruments)
- Espectrofotómetro V-160, UV Visible Recording Spectrophotometer Simadzu.
- Fuentes de poder para electroforesis: Gibco BRL modelo 250; Pharmacia Biotech modelos EPS 600, EPS 3500, EPS 3501

- Hornilla eléctrica
- Horno (Precision Scientific, Inc)
- Horno microondas (Samsung)
- Incubador baño seco (Precision scientific)
- Liofilizador Speed Vac® (Plus Savant, modelo SC110A)
- Máquina para hacer cubos de hielo (Scotsman)
- Máquina purificadora de agua (Milipore, Mili Q Plus)
- Microcentrífuga Eppendorf modelo 5415 C
- Micropipetores: Eppendorf de 0.05-2.5 µl, 0.5-10 µl, 1-20 µl, 50-200 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl; GILSON de 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl.
- Multicanal Labsystems 5-50 µl.
- pH metro: pH meter 240 (CORNING)
- Procesador de Imágenes Eagle Eye™ II-STRATAGENE®
- Refrigerador a 4°C y –20°C (Sear, Boelouck & Co. Modelo 63571 73571)
- Selladora de plásticos, Impulse Sealer Tish-300/450W TEHECD.LTD
- Scanner
- Shaker ambiental
- Termociclador MJ RESARCH INC, modelo PTC-100TM
- Vortex.

### **III.1.4 Material químico**

- Aceite mineral (Sigma)
- Ácido acético glacial 100% (Merck)
- Ácido bórico (Fisher Scientific)
- Acrilamida (Sigma)
- ADN Fago Lambda (Gibco)
- ADN del plásmido pUC-18 (obtenido en el lab. de biología molecular del CIP)
- Agarosa (Gibco, Ultra Pure™)
- Agua destilada

- Agua libre de nucleasas (Sigma)
- Agua Mili Q
- Alcohol 96%
- Alcohol isoamílico (Sigma)
- Ampli Taq ADN pol (Producida en laboratorio-CIP)
- ARNasa (Sigma)
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Mercaptoetanol (Sigma)
- Bind Silane®
- Bis-acrilamida (Sigma)
- Bromuro de etidio (Sigma)
- Carbonato de Sodio (Merck)
- Cloroformo (Merck)
- Cloruro de Magnesio (Sigma)
- Cloruro de Potasio (Sigma)
- Cloruro de Sodio (Merck)
- CTAB (Aldrich)
- dNTPs (Life Technologies™)
- EDTA (Sigma)
- Enzima de restricción PstI (Gibco)
- Etanol absoluto (Merck)
- Extran® (Merck)
- Formaldehído 37% (Fisher Scientific)
- Formamida (Sigma)
- Hidróxido de sodio (Fisher Scientific)
- Iniciadores (Gibco, Genset y Operon technologies™)
- Isopropanol (Merck)
- Kit de secuenciamiento (Silver Sequence™ DNA-Promega)
- 2-Propanol (Merck)
- Lejía
- Naranja G (Sigma)

- Nitrato de Plata (Química Service)
- Nitrógeno líquido
- Persulfato de amonio (Sigma)
- PVP (Sigma)
- Rain X® (Unelko Corporation)
- Revelador y Fijador de Fotografía (Kodak® GBX 5X)
- PlusOne Repel-Silane (Amersham Pharmacia Biotech)
- SigmaCote®
- Sucrosa (Sigma)
- TEMED (Sigma)
- Tiosulfato de sodio (Fisher Scientific)
- Tris (Tris [hidroxi metil] amino etano) (Sigma)
- Urea (Sigma)
- Xilen cianol (Sigma)

### **III.1.5 Software**

NTSYS pc 2.1

## III.2 MÉTODOS

### III.2.1 Determinación del contenido de materia seca

Principio: La humedad de la muestra se pierde por volatilización a causa del calor. La cantidad de material residual después de eliminar la humedad, constituye la materia seca.

#### Procedimiento

Se escoge los tubérculos frescos al azar y se procede a picarlos en forma de hojuelas de forma circular de 1,5mm de espesor, se hace una mezcla para tener una muestra más homogénea, se pesa 100 grs. y se coloca en una bolsa, inmediatamente se introduce a nitrógeno líquido, para luego ponerlas al liofilizador por un periodo de 10 días (secado al frío), para asegurarnos que estén bien secas las muestras. Luego pesar la muestra ya seca y la diferencia llevada a porcentaje es el contenido de materia seca (Método CIP-Laboratorio de procesamiento)

$$\% \text{ Contenido de Materia seca} = \frac{\text{P. final} \times 100}{\text{P. Inicial}}$$

### III.2.2 Fritura

Estas papas nativas para su fritura no necesitan pelarse ya que por las formas que presentan esto sería un trabajo muy arduo y además se perdería mucho material.

Se seleccionaron tubérculos aptos para la fritura, luego lavamos manualmente y se lleva a la máquina cortadora en forma de hojuelas. El grosor de las rebanadas es variable, y esto se ve de acuerdo a sus características, el corte tiene

un grosor de 0.5mm; estas rebanadas pasan a la etapa del segundo lavado, donde el almidón superficial es liberado, esto se hace para que las hojuelas no se peguen unas a otras durante el proceso de la fritura y evitar efectos deteriorantes en el aceite al freír. El aceite a usarse debe ser claro y de buen sabor y no debe tener contener ácidos grasos libres, además debe estar a temperatura de 180°C. La fritura es hasta cuando el aceite deje de burbujear aproximadamente 3 minutos.

Para su evaluación se utiliza la escala de colores de 1 a 5 (Figura III.1), donde es 1 corresponde a un color claro crema o amarillo muy bueno y la escala 5 es un color marrón oscuro a negro considerado de muy mala calidad.



**Figura III. 1.** Escala de color de fritura de hojuelas o chips de papa.

### **III.2.3 Absorción de aceite**

Hojuelas aceitosas, que son indeseables al consumidor. Los factores más importantes que afectan el contenido del aceite son el contenido de materia seca, sequedad de la papa antes de freír, tipo de aceite, etc.

La cantidad de aceite que absorben las hojuelas en el proceso de fritura (contenido de aceite) requiere de una prensa Carver, y se hace triturando en un mortero una cantidad de hojuelas 20gr a 25gr mezclar bien (para que la muestras



sea representativa) y luego se pesa 10gr de hojuela (peso neto) llenar en un pistón y llevarla al un compresor por espacio de 2:30 minutos y a una presión de 20000 libras por pulgada cuadrada, mientras se comprime se nota que el aceite sale por los extremos superior e inferior del pistón de acero, la cual limpiamos con papel absorbente o higiénico; luego pesar la muestra comprimida, y la diferencia de peso es el la cantidad de aceite que absorbe, esto se hace con su respectiva repetición (Figura III. 2).

$$\% \text{ Contenido de hojuela seca} = \frac{\text{P. final} \times 100}{\text{P. Inicial}}$$

$$\% \text{ Contenido de aceite} = 100 - \% \text{ Contenido de hojuela seca}$$



**Figura III. 2** Muestras comprimidas de hojuelas de papa nativa (Prensa carver)

### **III.2.4 Determinación de azúcares reductores. Método de Ross (Ross, 1959)**

#### **III.2.4.1 Preparación del reactivo**

**Solución A.** Disolver 7.145 gr de 2,4-dinitrofenol en 230 ml de una solución de hidróxido de sodio al 5%. Calentar en baño maría hasta que el 2,4-dinitrofenol se disuelva, luego adicionar 2.5g de fenol y calentar algo mas si la solución no permanece clara (hasta 100°C).

**Solución B.** Disolver 100g de sal Rochelle (tartrato de sodio y potasio) en casi 500ml de agua destilada.

Mezclar ambas soluciones y llevar a 1000ml con agua destilada.

#### **III.2.4.2 Curva estándar**

- Pesar 0.2 g de glucosa y disolverlo en 100ml de agua destilada (2mg/ml).
- Luego preparar estándares con 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0mg/ml.
- Colocar 2ml de los estándares en tubos de ensayo y agregar 6ml del Reactivo de Ross.
- Luego colocar en baño María a 100 °C durante 6 minutos
- Enfriar con agua helada.
- Leer los estándares a 600nm de densidad óptica.

#### **III.2.4.3 Azúcares reductores**

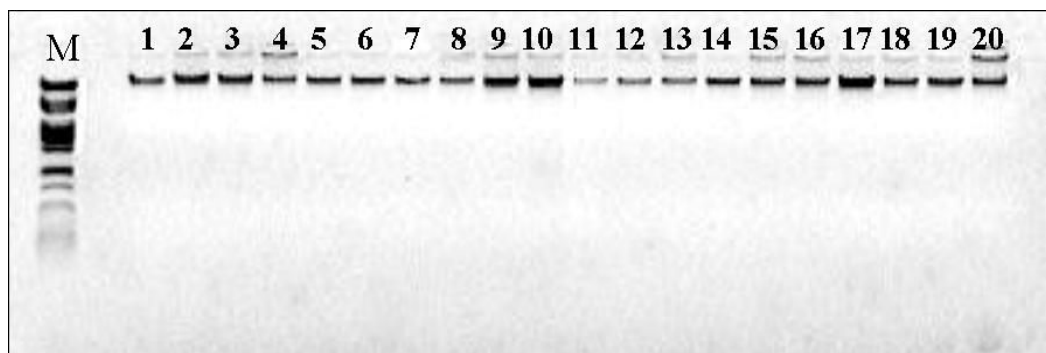
- Pesar 1g de polvo de papa liofilizada y agregar 40 ml de etanol al 80%. Agitar con la ayuda de un magneto durante 30 minutos.
- Filtrar el extracto empleando papel Whatman # 4 y enrasar el filtrado a 50 ml.
- De los 50 ml tomar 2 ml y agregar 6 ml del reactivo de Ross.
- Luego colocar en baño María a 100 °C durante 6 minutos
- Enfriar con agua helada.
- Leer las muestras a 600nm de densidad óptica.

### **III.2.5.- Extracción del ADN**

La extracción de ADN se realizó por el método de CTAB (CIP, 1997), a pequeña escala a partir de material proveniente de Huancayo (folíolos de plantas), de aproximadamente 2 meses de desarrollo (Anexo I).

#### **III.2.5.1 Cuantificación y calidad del ADN genómico**

La cuantificación del ADN genómico se hace por comparación de la intensidad de la banda, esto se determina por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v)(Anexo II.1), 1ul de ADN genómico extraído de las hojas de papa, es diluido en 5ul de agua libre de nucleasas y se añade 2ul de tampón de carga SALB 10X (Anexo II.2), que da densidad a la muestra. Como tampón de corrida se usa TBE-1X (Anexo II.3) añadiendo a éste bromuro de etidio que sirve para visualizar el contenido de ADN, cuando sea expuesto a los rayos ultravioleta. La corrida se realiza en una cámara para electroforesis horizontal a un voltaje que puede oscilar entre 70 y 90 voltios de corriente eléctrica. Se compara el marcador conocido, en nuestro caso 1ul de ADN del fago lambda es cortado con la endonucleasa de restricción PstI (Anexo III), donde la primera banda es equivalente a 280n/g. (Figura III.3). Se carga en el gel ya preparado 10ul de Pst I, generalmente al lado izquierdo comenzando el gel en los otros pocillos consecutivos todo el contenido del ADN genómico diluido de las muestras a cuantificar, por un lapso de 1 hora y 45 minutos, luego se visualiza por el Eagle Eye, y se hace una toma de la imagen para su comparación correspondiente.



**Figura III.3** Valoración del ADN genómico de papa por electroforesis en geles de agarosa donde M: Marcador fago lambda, estándar de peso molecular cortado con la enzima de restricción Pst1, donde la primera banda equivale a 280ng, vemos las primeras 20 muestras.

### III.2.5.2 Estandarización de la calidad del ADN

Una vez realizada la cuantificación del ADN diluido, lo llevamos este a una concentración de 1ng/ul, (Figura III.4) para ser usado como molde o templado; en un volumen final de 500ul, hacemos las diluciones con agua libre de nucleasas o agua milli Q autoclavada según la formula:  $C1V1 = C2V2$  y lo guardamos a temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$  en una caja de dilución de un 1ml de capacidad, para su subsiguiente uso.

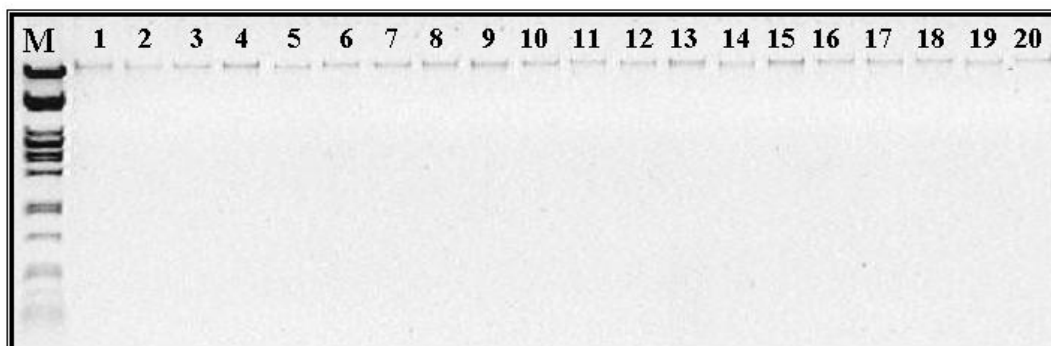
Donde:

C1= Concentración inicial

C2= Concentración final

V1= Volumen inicial

V2= Volumen final



**Figura III. 4** ADN Templado de las primeras 20 muestras. 1ng/ul

### III.2.6 Amplificación de la región de Microsatélites mediante PCR

Las amplificaciones de los marcadores microsatélites fueron hechas según la mejor performance, que esta dio, como resultado de algunas reacciones previas, para esto se variaron las cantidades de los componentes y escogimos el master mix mas adecuado. (Tabla III.2)

**Tabla III.2** Protocolo de amplificación mediante PCR de una muestra

Reactivos	Cantidad
Agua libre de nucleasas (NFW)	6.12µl
Tampón de reacción 10X(Buffer Bob)	2.00µg
DNTP 5mM	0.80µl
Par de iniciadores 10µM	1.00µl
Taq polimerasa (1(U/µl)	0.08µl
ADN tamplado (1ng/µl)	10.00µl

Las amplificaciones fueron preparadas en un volumen final de 20µl de reacción para una sola muestra: 100mM de Tris-HCl, 20mM de Sulfato de Amonio, 2.5mM de Cloruro de Magnesio, 0.2mM de cada uno de los cuatro dNTPs, 0.5µM de cada iniciador (sentido y antisentido), 1U de Taq polimerasa y 10ng de ADN geonómico (ADN templado)

Luego de adicionar el ADN templado o molde, se hace una mezcla uniforme, y antes de llevarlo al termociclador los cubrimos con aceite mineral 25ul y verificar que no haya burbujas.

Las amplificaciones de las regiones microsatélites fueron llevadas a cabo mediante el Programa de amplificación de las secuencias Microsatélites (Tabla 3), en un termociclador PTC-100, bajo ciertas condiciones, consistentes en una serie de ciclos en función del tiempo y la temperatura. El primer ciclo es por un tiempo

de 3 minutos a 94 C, luego 30 ciclos a tres distintas temperaturas en diferentes periodos de tiempo: 1 minuto para la denaturación del ADN, es decir poder separar las hebras del ADN molde y del iniciador; 2 minutos a la temperatura de apareamiento (temperatura en la cual el iniciador se une correctamente con la región complementaria en el ADN molde) esta temperatura está determinada para cada iniciador, está estandarizada para los 18 primers o iniciadores, luego 1 minuto con 30 segundos para la síntesis a 72°C, es la temperatura óptima para la Taq polimerasa realice la síntesis y finalmente 5 minutos de síntesis a 72°C, que es el ciclo de elongación (Tabla III.3).

**Tabla III.3** Programa de amplificación de las secuencias de microsatélites.

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1 ciclo	94	3.0
30 ciclos	94	1.0
	T° apareamiento	0.5
	72	1.5
Final	72	5.0

#### III.2.6.1 Obtención de los Marcadores Microsatélites

Para la obtención de los patrones de bandas de los 40 genotipos, se utilizaron 18 pares de iniciadores microsatélites (Tabla III.4), con programas de amplificación de las secuencias ya establecidas (idem anterior) donde las temperaturas de apareamiento son: 47°C, 50°C, 53°C, 55°C y 57°C. Los iniciadores fueron seleccionados, por su alto grado de polimorfismo, además estos cubren o están presentes por lo menos en algún cromosoma de la papa. Estos iniciadores fueron seleccionados y propuestos por el CIP (Ghislain et al., 2000)

**Tabla III.4** Dieciocho pares de iniciadores microsatélites utilizados en el presente trabajo.

<b>Código CIP</b>	<b>Código SCRI</b>	<b>Posición en el Mapa</b>	<b>Motivo rapetido</b>	<b>Tm(°C)</b>
S011	STM0019	VI	(AT) <sub>7</sub> (GT) <sub>10</sub> (AT) <sub>4</sub> (GT) <sub>5</sub> (GC) <sub>4</sub> (GT) <sub>4</sub>	47
S020	STM1031	V	(AT) <sub>13</sub>	55
S024	STGBSS	VIII	(TCT) <sub>9</sub>	53
S029	STPoAc58	V	(TA) <sub>13</sub>	57
S036	STM1053	III	(TA) <sub>4</sub> (ATC) <sub>5</sub>	55
S042	STM0037	XI	(TC) <sub>5</sub> (AC) <sub>6</sub> AA (AC) <sub>7</sub> (AT) <sub>4</sub>	53
S047	STM0030	XII	compuesto (GT/GC)(GT) <sub>8</sub>	53
S051	STM1016	VIII	(TCT) <sub>9</sub>	53
S052	STM0031	VII	(AC) <sub>5</sub> ... (AC) <sub>3</sub> (GCAC) (AC) <sub>2</sub> (GCAC) <sub>2</sub>	57
S056	STM1049	I	(ATA) <sub>6</sub>	57
S069	STWAX-2	VIII	(ACTC) <sub>5</sub>	53
S081	STM1104	VIII	(TCT) <sub>5</sub>	57
S084	STM1052	VII	(AT) <sub>14</sub> GT (AT) <sub>4</sub> (GT) <sub>6</sub>	FF3
S089	STM3012	IX	(CT) <sub>4</sub> , (CT) <sub>8</sub>	57
S095	STM3023	IV	(GA) <sub>9</sub> , (GA) <sub>8</sub> , (GA) <sub>4</sub>	50
S101	STM1106	X	(ATT) <sub>13</sub>	55
S104	STM2013	VII	(TCTA) <sub>6</sub>	55
S106	STM2022	II	(CAA) <sub>3</sub> ...(CAA) <sub>3</sub>	53

Para el iniciador S084 se tuvo que utilizar un programa de amplificación alternativo FF3 (“touchdown”). La PCR fue llevada a cabo mediante un programa “touchdown” (Don *et al.*, 1991) que es un programa de termociclación aplicado a la PCR, que incluye una subrutina inicial (protocolo “touchdown”) en la cual la temperatura de hibridación decrece en cada ciclo, mientras que el resto del programa utiliza una única temperatura de hibridación. (Tabla III.5). Aquí se utiliza dos temperaturas diferentes de hibridación, para reducir amplificaciones no específicas que presenta este iniciador.

**Tabla III. 5** Programa de amplificación alternativo (PAA) para el iniciador S084.

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1 ciclo	94	2.0
16 ciclos	94	1.0
	60	2.0
	72	1.5
	94	1.0
	50	2.0
	72	1.5
1 ciclo	72	5.0

### **III.2.7 Electroforesis de los productos amplificados**

Luego de la amplificación en el termociclador sacamos la muestra (20µl) y adicionamos 10µl del tampón de carga (se agrega el 50% del volumen final de la reacción - Formamida 96%, 10mM EDTA pH 8.0, 0.05% de azul de bromofenol y 0.05% de xilen cianol) a cada pocillo que contiene el producto amplificado, y no se deja que formen burbujas caso contrario se quitan con mucho cuidado, antes de denaturarlas.

#### **III.2.7.1 Denaturación**

Antes de ser cargadas a un gel de poliacrilamida véase el anexo IV (donde se detalla la preparación) son denaturadas, es decir se lleva al Termociclador para lo cual usamos el programa “Denature” con la opción “Deseable” (porque estamos usando aceite mineral), por un lapso de 5 minutos que dura el programa a una temperatura de 95C. Inmediatamente después lo llevamos a hielo para evitar la renaturación.



### III.2.7.2 Cargado del gel de Poliacrilamida

Previamente al cargado, el gel es pre-corrido en una fuente de poder a voltaje de 1600V durante 30 minutos, luego limpiamos bien con una jeringa hipodérmica, los restos que puede haber de sales y de acrilamida, se colocan los peines con mucho cuidado, sin dañar el gel y no muy profundo, lo suficiente para que entre toda la muestra a ser cargada.

Con un pipetor adecuado y un tip de punta fina, cogemos 6ul de muestra y cargamos este producto amplificado para ser separados en los geles denaturantes de poliacrilamida 6% , corridos en una cámara vertical de electroforesis de secuenciamiento modelo S2 (Gibco BRL), usando como gradiente de corrida TBE 1X y 0.5X , para el ánodo y cátodo respectivamente. Terminado de cargar las muestras se deja correr a 1600 V, por un lapso de 10 minutos, tiempo en el cual las muestras penetran al gel. Luego se baja el voltaje a 420V y dejamos que corra toda la noche.

### III.2.8 Electroforesis

La electroforesis se lleva a cabo hasta obtener las bandas en el tercio inferior del gel, para poder tener una separación mejor de los alelos y poder scorear mejor, y esto se obtiene por el tamaño del producto amplificado que será diferente para cada iniciador, además por el conocimiento que el Xilen-cianol migra en forma de un fragmento de doble hebra de ADN de 106 bp y el azul de bromofenol como uno de tamaño de 26pb en geles de poliacrilamida 6%.

Como marcador de peso molecular se carga 4ul de la reacción de secuenciamiento del plásmido pUC-18 digerido por la endonucleasa de restricción *MspI* para determinar el peso en pares de bases de las bandas (Anexo V). También antes de cargar denaturar por 5 minutos a 95°C.

### **III.2.9 Detección de los Microsatélites**

Luego que termina la corrida electroforética, que dependiendo del primer, se retiran las placas de vidrio de la cámara vertical. Luego separamos, el vidrio pequeño es el que lleva adherido el gel, que es depositado en la bandeja de plástico muy limpia.

Para ver los alelos de los marcadores moleculares de tipo microsatélites, se uso la técnica de Tinción con Nitrato de Plata como (Anexo VI) protocolo de tinción no radioactivo, sugerido por Promega (Promega Corporation, 1996), modificado de la siguiente manera:

Como fijador se emplea el ácido acético al 10%, el vidrio pequeño es puesto en la solución de 1 litro ácido acético 10%, el cual debe permanecer en agitación durante 25 minutos aproximadamente, en el caso que sea su primer uso, y 30 minutos a mas en usos subsecuentes, hasta 4 usos en la cual la usamos como agente detenedor. La función del fijador es la no-difusión de las moléculas de ADN, también remueve químicos y sales como úrea y el tampón de corrida (azul de bromofenol y xilen cianol – Promega Corporation. 2000. Silver sequence-TM DNA sequencing system. Technical manual EE.UU.)

#### **III.2.9.1 Primer Lavado**

Luego del tiempo en ácido acético, el gel es lavado 2 veces en 900ml de agua destilada por un tiempo de 4 y 3 minutos respectivamente, debe estar en agitación. En este paso el agua destilada remueve el ácido acético que queda, otras sustancias remanente de sales y restos de acrilamida que quedan después y que interfieren en la tinción.

### **III.2.9.2 Tinción del Gel**

Luego de fijar el gel, este es colocado en una solución de nitrato de plata (1000ml) y agitado por espacio de 30 minutos en caso que sea el primer uso y se aumenta el tiempo en los usos subsiguientes, hasta 4 usos inclusive.

El nitrato actúa como agente impregnante en medios débilmente ácidos y reacciona con los nucleótidos: guanina, adenina, citosina y timina, el formaldehído es un agente reductor de plata en condiciones alcalinas. La plata se reduce a tasas muy bajas; lo cual produce sitios de nucleación inicial alrededor del sustrato de tinción (Caetano, 1994) y durante el revelado en estos sitios favorecen la acumulación de plata reducida.

### **III.2.9.3 Segundo Lavado**

Después sacamos el gel del nitrato de plata e inmediatamente pasamos a una bandeja que contiene 900ml de agua destilada y se enjuaga por un tiempo de 4 segundos en el agitador o moviendo la bandeja manualmente suavemente. Este paso es para limpiar remanentes de plata, ya que pueden causar precipitados oscuros en el revelado (Caetano-Anolles, 1994), pero enjuagues de mas de 10 segundos disminuyen la intensidad de las bandas se puede volver a la solución de nitrato

### **III.2.9.4 Revelado**

El último paso corresponde al revelado, el gel es depositado en una bandeja especial para revelar los geles, que contiene 750ml de la solución reveladora de carbonato de sodio y luego agitamos manualmente hasta obtener la intensidad y contrastes de las bandas que corresponde a los microsatélites. Los

sitios de nucleación favorecen la rápida acumulación de depósitos de plata metálica reducida.

El cambio brusco de pH produce en el gel la formación de sales de plata insolubles en forma de cristales, lo cual es producido por el carbonato de sodio. La función del Tiosulfato es de disolver los iones de plata insolubles, incrementando su potencial redox, minimizando la tinción del “background” (Caetano-Anolles, 1994)

### **III.2.10 Caracterización de los alelos**

La caracterización de los alelos se hace registrando el peso molecular de los alelos en pares de bases por comparación con las bandas del secuenciamiento del plásmido *pUC-18* (Anexo V).

Por la denaturación los fragmentos de ADN se separan en dos cadenas o hebras, estas tienen diferente composición en nucleótidos, por lo tanto diferente carga eléctrica, estructura terciaria diferente y por ende su migración es distinta. Por eso preciamos el alelo partido o dividido, y para el tamaño tomamos la banda superior en pares de bases (Ishii *et al.*, 2001).

### **III.2.11 Registro de patrones de las bandas obtenidas**

Para el registro de los datos se utiliza el sistema binario de 1 y 0. se asigna la presencia del número 1 y la ausencia el 0 (Cho *et al.*, 2000).

También se da casos en que el alelo no está presente luego de ser amplificado lo que conocemos como alelo nulo. Esto se registra en una hoja de cálculo de Excel Window para luego ser analizado por el NTSYS.

### III.2.12 Análisis de los Resultados

El PIC (Polymorphic Information Content) de los 18 iniciadores utilizados, para ver el nivel de polimorfismo de cada locus, se calculó con fórmula descrita por Saal y Wricke (1999), basado en el valor de la heterocigocidad (H):

$$\text{PIC} = H = 1 - \sum_{i=1}^n (P_i)^2$$

Donde :  $P_i$  es la frecuencia del  $i$  – ésimo alelo (fenotipo) del número total de alelos y  $n$  el número de los diferentes alelos (fenotipos) observados en la muestra.  $H$  es la probabilidad que 2 alelos tomados o hechos un muestreo al azar de la población pueda ser diferenciados .

El valor del PIC da un estimado del poder discriminatorio de un locus teniendo en cuenta: el número de alelos que son expresados, y la frecuencia relativa de estos alelos. El PIC tiene valores que van desde 0 cuando es totalmente monomórfico hasta 1 (altamente discriminativo, con muchos alelos con frecuencia similar).

#### III.2.12.1 Coeficiente de asociación

Para analizar información provista por marcadores moleculares microsatélites las medidas de similaridad que utilizan son datos de presencia o ausencia (Dudley, 1998). Por otro lado para estimar las distancias génicas entre los cultivares nativos de papa, mediante el programa NTSYS-PC (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System for personal computers) software, Versión 2.1 (Rohlf, 1992), se utilizó el coeficiente de similaridad DICE (1945), basado en la presencia o ausencia de alelos. Se empleo el coeficiente de asociación DICE, para hallar la matriz de similitud. La formula empleada en este coeficiente es el que sigue:

$$DICE_{ij} = \frac{2a}{2a+b+c}$$

i y j son los genotipos que se están comparando (Crisci, 1983; Rohlf, 1993).

La coincidencia de ausencia en un alelo no debe considerarse como parte de la similitud, ya que se estaría sobreestimando su valor. Por esta razón, coeficientes como el de DICE que no consideran estas coincidencias de ausencia en su evaluación, es apropiado en este tipo de estimaciones para marcadores codominantes.

### III.2.12.2 Análisis de agrupamiento

Los datos binarios generados por los microsatélites en forma de unos y ceros fueron procesados mediante el programa de taxonomía numérica NTSYS, para hallar los coeficientes de similaridad. Las asociaciones entre cultivares nativos, a partir de los datos de secuencias microsatélites (ceros y unos) y de actividad combinatoria específica, da lugar a la matriz de similaridad, obtenida de esta forma, fue sujeta al análisis de clusters utilizando el algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic average) con el programa NTSYS descrito por el “Working group on Biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular” (1997). El algoritmo utiliza como regla de jerarquización la minimización de la distancia génica entre grupos, definida como el promedio aritmético no ponderado entre un grupo i de m individuos y otro grupo j de n individuos, esto es,

$$d_{ij} = \frac{1}{mn} \sum_{h=1}^m \sum_{l=1}^n d(ih, jl)$$

Donde: el h-ésimo y el l-ésimo individuo pertenecen al i-ésimo y j-ésimo grupo respectivamente.

Luego de calcular la similitud entre individuos, lo común es hacer técnicas de agrupamiento en árboles o dendogramas (Van Hintum, 1995) donde están agrupados los OTUs por similaridad. Mediante este análisis el posible partir o subdividir a una población de “n” individuos a un numero determinado de subgrupos, teniendo en cuenta el grado de homogeneidad interna de cada grupo, optimizando el grado de homogeneidad interna de cada uno (Quevedo, 1993)

## IV RESULTADOS

### IV.1 Procesamiento

#### IV.1.1 Materia seca

El promedio de contenido de materia seca de los 40 cultivares nativos en los tratamientos 10 días después de cosecha, 90 días almacén temperatura ambiente (T.A.) y 90 días almacenada en cámara fría 4 °C (C.F.), fue: 27.04%, 27.73% y 27.58% respectivamente, el rango esta entre: 20.99% del cultivar andígena “Negritas” (703787) y 33.42% del cultivar goniocalix “Unknown” (703279). Vemos que el porcentaje más alto es para el tratamiento 90 días temperatura ambiente que hay un incremento de 0.69% entre el primer y segundo tratamiento, 0.55% de incremento entre el primer y tercer tratamiento y de 0.15% decremento entre el segundo y tercer tratamiento.

Podemos apreciar el cuadro comparativo de estos tres tratamientos (Tabla IV.1 y Gráfico 1), vemos que hay variedades con altos contenidos de materia seca encima del 30%. Apreciamos que 9 cultivares tienen promedios por encima del 30%. Siendo estos: 703279 “Unknown” (33.42%), 704393 “Maria Cruz” (33.04%), 703777 “Shumajperga” (32.64%), 701862 “Amarilla Tumbay” (32.44%), 703314 “Yana Turuna” (32.04%), 701941 “Higos” (31.68%), 703844 “Challina” (30.98%), 701940 “Coletto” (30.24%), 705543 “Yana Warmi” (30.0%). Estos valores son el promedio de materia seca de los tres tratamientos mencionados liofilizado.

En este trabajo, estos cultivares nativos fueron seleccionados por su calidad de fritura (25 buenos y 15 entre regulares a malos) en todo caso lo vamos a agrupar por su ploídia y por especie. Identificamos cultivares nativos que presentan mayor contenido de materia seca, siendo estos rescatables para usos industriales, que uno de los requisitos fundamentales es el contenido de materia seca. Vemos que hay ligeros incrementos en el contenido de materia seca en los tratamientos mencionados.



**Tabla IV.1** Contenido de materia seca de 40 cultivares nativos en los tratamientos.

Código CIP	Spp	MS 10 días	MS 90 días	MS 90 días
			T.A.A	C.F.A
701014	Juz	24.83	24.42	23.49
701131	Adg	27.24	26.76	27.05
701165	Stn	24.52	25.50	25.99
701273	Adg	29.48	30.06	29.56
701633	Stn	25.90	24.92	23.97
701862	Gon	32.33	32.82	32.17
701940	Adg	29.45	30.44	30.83
701941	Adg	32.28	32.39	30.37
702363	Adg	21.46	21.86	21.20
702477	Adg	21.96	22.72	22.23
702915	Adg	23.22	23.60	22.78
702937	Cur	24.80	25.46	24.64
703168	Gon	25.98	28.77	29.31
703257	Adg	27.02	27.26	27.04
703269	Adg	23.18	23.24	24.75
703279	Gon	32.69	33.29	34.28
703287	Stn	28.00	29.61	29.57
703314	Stn	30.42	32.93	32.78
703421	Stn	27.41	29.36	29.52
703445	Stn	27.05	28.57	28.94
703488	Adg	26.09	25.88	25.85
703698	Stn	26.74	27.05	27.78
703768	GxS	27.73	28.75	28.62
703777	Gon	32.24	32.59	33.10
703787	Adg	20.58	21.28	21.12
703825	Gon	28.18	28.58	28.53
703831	Gon	25.87	25.57	24.97
703844	Stn	31.07	30.53	31.33
703978	Stn	28.82	28.11	28.97
704022	Stn	25.06	25.12	23.84
704143	Adg	27.10	26.58	24.41
704327	Cha	27.02	28.61	29.12
704356	Adg	23.81	22.90	23.19
704393	Gon	31.77	34.24	33.12
704481	Gon	25.09	25.90	26.96
705280	Adg	25.71	28.35	26.15
705543	Cha	28.12	30.82	31.00
706134	Stn	27.89	29.35	30.08
706346	Adg	25.48	26.52	26.12
706819	Adg	27.84	28.52	28.62
<b>Promedio</b>		27.04	27.73	27.58

#### IV.1.2 Fritura

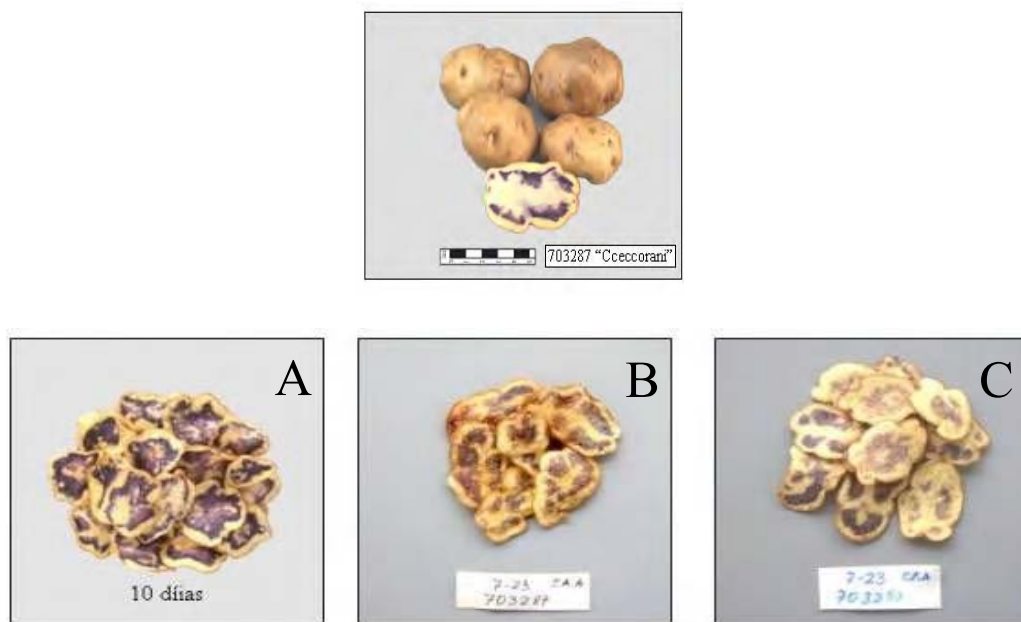
La fritura en hojuelas de estas cultivares nativos podemos verla en la Tabla IV.2 y Gráfico 2; podemos apreciar que hay cultivares excelentes en fritura con grado 1 y 2 de color, en los tres tratamientos. Como ejemplo tenemos a los de los cultivares: 703287 (“Ceccorani”) y 705280 (“Murunguilla”) con grado de color muy aceptable en los tres tratamientos (Figura: IV.1 y IV.2). Y algunas variedades nativas muy malas en los tres tratamientos fritura por encima del grado 3.5 hasta 5 cuyo color es negrusco oscuro y negro (estos son fueron los cultivares comparativos).

En cuanto a los tratamientos tenemos que papas almacenadas a C.F., son las que mostraron mayor incremento en el color y se puede corroborar con la Tabla IV.2.

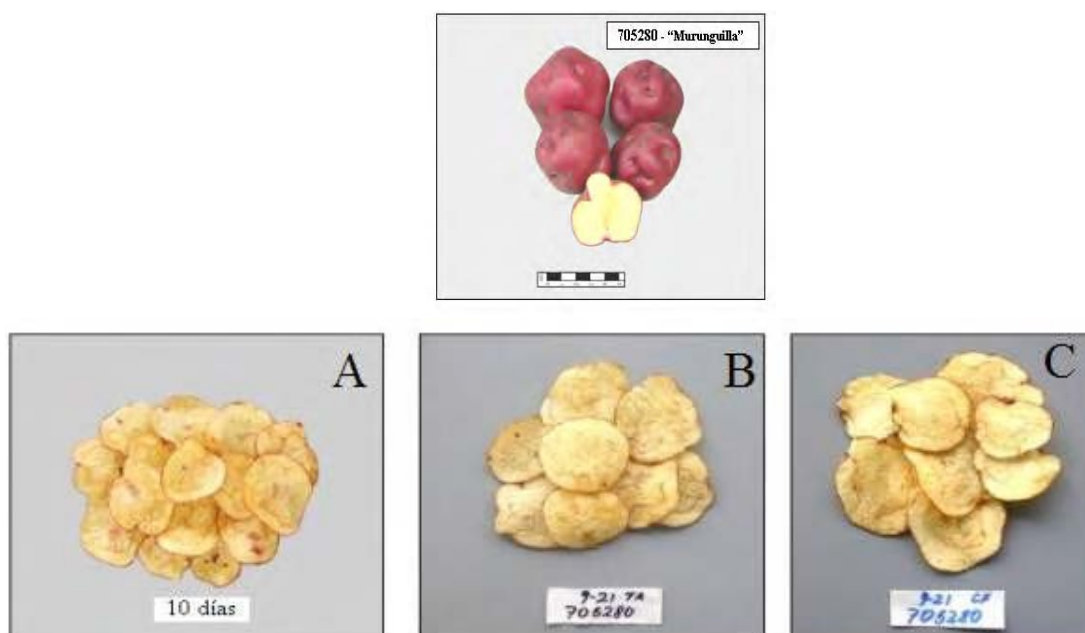
Los cultivares nativos diplóides fueron los que mejor performance presentaron en el proceso de frituras, mantuvieron con buen nivel de fritura incluso en los tres tratamientos, pero hay algunas excepciones bien marcadas: 701633 “Pirampo”, 703698 “Capacho azul”, 703978 “Kellu chojllu”(Tabla IV.2 y Gráfico 2), observamos que a 10 días después de la cosecha su fritura fue mala, pero se estabilizan en los dos tratamientos posteriores.

Al hacer un comparativo por especies tenemos que los cultivares tetraploides representados por *S. andigena*: 702937 “Laram Ocucuriu” y la papa amarga representado por *S. juzepczukii*: 701014 “Huataqui”, ha presentado el más altos grado de fritura.

Otra cosa importante que puede observarse es que algunos cultivares fríen mal en el primer tratamiento de 10 días después de la cosecha, y luego se estabilizan en los dos tratamientos posteriores tal es el caso de: 703978 “Kellu Chojllu” y 703698 “Capacho Azul” y esto hace variar el coeficiente de correlación entre fritura y azúcares reductores en los tratamientos efectuados.



**Figura IV.1** Color de fritura del Cultivar 703287 (“Ceccorani”). A) a 10 días de cosecha (grado de fritura 1.5), B) 90 días a temperatura ambiente (T.A.) (grado de fritura 2.0), C) 90 días almacenada en cámara fría (C.F.) (grado de fritura 1.5)



**Figura IV.2** Color de fritura del Cultivar 705280 (“Murunguilla”). A) a 10 días de cosecha (grado de fritura 1.0), B) 90 días a temperatura ambiente (T.A.) (grado de fritura 1.0), C) 90 días almacenada en cámara fría (C.F.) (grado de fritura 1.0)

#### **IV.1.3 Absorción de aceite**

La absorción de aceite en general se mantuvo constante en los tres tratamientos: 10 días después de la cosecha, 90 días almacenados a temperatura ambiente y 90 días almacenado a cámara fría 4°C. Hay un ligero incremento en el tratamiento 90 días almacenados a temperatura ambiente, (Tabla IV.3 y Gráfico 4), podemos decir en general que los tratamientos no influyeron en el proceso de absorción de aceite. Podemos destacar a dos cultivares que presentan alto contenido de absorción de aceite: 703269 “Chaucha Roja” y 701633 “Pirampo” con casi 40% y no recomendable para el proceso de industrialización. Y cultivares nativos excelentes en fritura y con bajos niveles de absorción de aceite: 703287 “Cceccorani” con 22.12%, 703279 “Unknown” con 22.37%, 703168 “Puca Pishgush” con 23.11%, 703825 “China Runtush” con 23.55%, 703844 “Añil Papa” con 24.31%, 701165 “Calhua Rosada” con 24.59%, 703831 “Pampuna” con 24.83%; todos estos con contenido menor del 25% del peso total.

**Tabla IV.2** Valoración del Color de Fritura de los cultivares nativos de papa en los tres tratamientos (Evaluación visual por el color por: Ing. Walter Amorós – Carlos Alvarado)

Código CIP	Spp	MS 10 días	MS 90 días	MS 90 días
			T.A.A	C.F.A
701014	Juz	4.5	3.5	4.0
701131	Adg	3.5	3.0	4.5
701165	Stn	1.0	1.5	1.5
701273	Adg	3.5	3.0	5.0
701633	Stn	5.0	2.5	2.0
701862	Gon	2.5	1.5	4.0
701940	Adg	1.5	2.0	3.5
701941	Adg	2.0	1.5	3.5
702363	Adg	1.5	2.5	4.5
702477	Adg	5.0	4.0	5.0
702915	Adg	3.5	3.5	4.0
702937	Cur	5.0	3.5	5.0
703168	Gon	1.0	1.0	1.5
703257	Adg	1.5	1.5	4.0
703269	Adg	2.5	3.5	4.0
703279	Gon	1.0	1.0	1.0
703287	Stn	1.5	2.5	1.5
703314	Stn	2.0	2.5	3.0
703421	Stn	1.0	2.0	3.5
703445	Stn	3.5	2.0	2.5
703488	Adg	4.0	2.0	3.0
703698	Stn	3.5	1.5	1.5
703768	GxS	1.5	1.5	1.0
703777	Gon	2.5	2.0	1.0
703787	Adg	5.0	4.0	5.0
703825	Gon	1.5	1.5	1.5
703831	Gon	1.0	1.0	1.0
703844	Stn	1.0	1.0	1.0
703978	Stn	3.5	1.0	1.5
704022	Stn	1.0	2.0	1.5
704143	Adg	2.5	2.5	3.5
704327	Cha	1.0	1.0	1.0
704356	Adg	4.0	3.0	3.0
704393	Gon	1.5	2.5	2.0
704481	Gon	1.0	1.5	2.0
705280	Adg	1.0	1.0	1.0
705543	Cha	1.5	1.0	1.5
706134	Stn	1.0	2.0	1.5
706346	Adg	5.0	3.5	3.5
706819	Adg	3.5	2.0	2.0

**Tabla IV.3** Contenido de la Absorción de Aceite (%) de cultivares nativos de papa en los tres tratamientos: 10 días después de la cosecha, 90 días a temperatura ambiente almacén T.A. 90 días en cámara fría almacén C.F.(4°C).

Código CIP	Especie	Absorción de aceite 10 días	Absorción de aceite 90 días T.A.A	Absorción de aceite 90 días C.F.A
701014	Juz	24.06	25.70	24.88
701131	Adg	27.53	27.37	27.45
701165	Stn	23.18	25.99	24.59
701273	Adg	26.83	29.01	27.92
701633	Stn	38.64	38.49	38.56
701862	Gon	24.83	28.27	26.55
701940	Adg	23.81	26.69	25.25
701941	Adg	27.13	27.66	27.40
702363	Adg	31.82	32.17	31.99
702477	Adg	22.94	25.71	24.33
702915	Adg	27.91	29.22	28.56
702937	Cur	28.31	28.92	28.61
703168	Gon	22.33	23.89	23.11
703257	Adg	23.87	25.20	24.53
703269	Adg	36.25	39.58	37.92
703279	Gon	21.17	23.56	22.37
703287	Stn	21.62	22.62	22.12
703314	Stn	20.41	22.76	21.59
703421	Stn	27.77	28.30	28.04
703445	Stn	28.78	28.90	28.84
703488	Adg	27.26	30.96	29.11
703698	Stn	27.34	29.24	28.29
703768	GxS	27.18	26.67	26.93
703777	Gon	23.79	26.60	25.20
703787	Adg	32.74	33.12	32.93
703825	Gon	22.91	24.18	23.55
703831	Gon	24.37	25.30	24.83
703844	Stn	23.49	25.12	24.31
703978	Stn	24.67	24.33	24.50
704022	Stn	29.16	29.60	29.38
704143	Adg	30.83	29.73	30.28
704327	Cha	31.62	29.07	30.34
704356	Adg	31.28	33.57	32.43
704393	Gon	24.97	24.77	24.87
704481	Gon	27.82	27.97	27.89
705280	Adg	30.95	30.65	30.80
705543	Cha	26.72	25.33	26.03
706134	Stn	22.86	23.55	23.79
706346	Adg	33.96	35.35	34.65
706819	Adg	27.43	25.68	26.56

## **IV.2 Azúcares Reductores**

El método de Ross resulta bueno para cuantificar el contenido de azúcares reductores, resultó muy didáctico, de fácil manejo en las papas nativas y se cuantificó interpolando la absorbancia que nos daba el espectrofotómetro, con la curva estándar y nos dio los resultados siguientes, ver Tabla IV.4, donde la concentración final fue en: g/100g de muestras fresca.

Podemos ver que hay un incremento de los azúcares reductores en los tratamientos de 90 días almacenada a diferentes temperaturas, sobre todo a 4 °C donde se ve claramente que los niveles más altos se encuentran en este tratamiento. Vemos que hay un significativo aumento de los azúcares reductores, principalmente de glucosa y fructuosa, que son los azúcares reductores por excelencia.

Una de las principales características para un buen procesado de papas en general es el contenido de azúcares reductores, se busca cultivares que tengan bajos niveles, para procesados en hojuelas se requiere menos de 0.2g/100g de muestra fresca.

Estas papas nativas al cuantificar el contenido de azúcares reductores, se observó que muchas de ellas contienen muy poco azúcares reductores (eso también dificultó la cuantificación cambiando el protocolo de Ross), lo que les hace muy aptas para la industria del procesado, con niveles muy bajos, como se puede apreciar en la Tabla IV.4 y Gráfico 3.

**Tabla IV.4** Contenido de Azúcares Reductores de cultivares nativos de papa en los tres tratamientos: 10 días después de la cosecha, 90 días a temperatura ambiente almacén T.A. 90 días en cámara fría almacén C.F.(4°C).

Código CIP	Especie	Contenido de AR 10 días	Contenido de AR 90 días T.A.A	Contenido de AR 90 días C.F.A
701014	Juz	0.564	0.658	0.737
701131	Adg	0.157	0.408	0.404
701165	Stn	0.024	0.054	0.025
701273	Adg	0.175	0.607	0.546
701633	Stn	0.168	0.228	0.461
701862	Gon	0.041	0.060	0.169
701940	Adg	0.077	0.231	0.443
701941	Adg	0.106	0.128	0.519
702363	Adg	0.098	0.242	0.604
702477	Adg	1.000	1.477	1.558
702915	Adg	0.199	0.653	0.857
702937	Cur	0.176	0.438	0.594
703168	Gon	0.023	0.031	0.027
703257	Adg	0.019	0.020	0.025
703269	Adg	0.386	0.456	0.397
703279	Gon	0.029	0.026	0.023
703287	Stn	0.131	0.214	0.237
703314	Stn	0.034	0.039	0.087
703421	Stn	0.027	0.026	0.033
703445	Stn	0.065	0.058	0.058
703488	Adg	0.126	0.141	0.171
703698	Stn	0.381	0.912	1.120
703768	GxS	0.069	0.079	0.077
703777	Gon	0.040	0.026	0.024
703787	Adg	0.553	0.986	1.303
703825	Gon	0.019	0.031	0.021
703831	Gon	0.018	0.021	0.018
703844	Stn	0.026	0.035	0.022
703978	Stn	0.147	0.184	0.135
704022	Stn	0.022	0.021	0.027
704143	Adg	0.287	0.304	0.311
704327	Cha	0.032	0.033	0.022
704356	Adg	0.161	0.171	0.429
704393	Gon	0.028	0.029	0.032
704481	Gon	0.023	0.025	0.113
705280	Adg	0.026	0.045	0.041
705543	Cha	0.033	0.042	0.044
706134	Stn	0.098	0.178	0.263
706346	Adg	0.312	0.342	0.296
706819	Adg	0.302	0.362	0.357



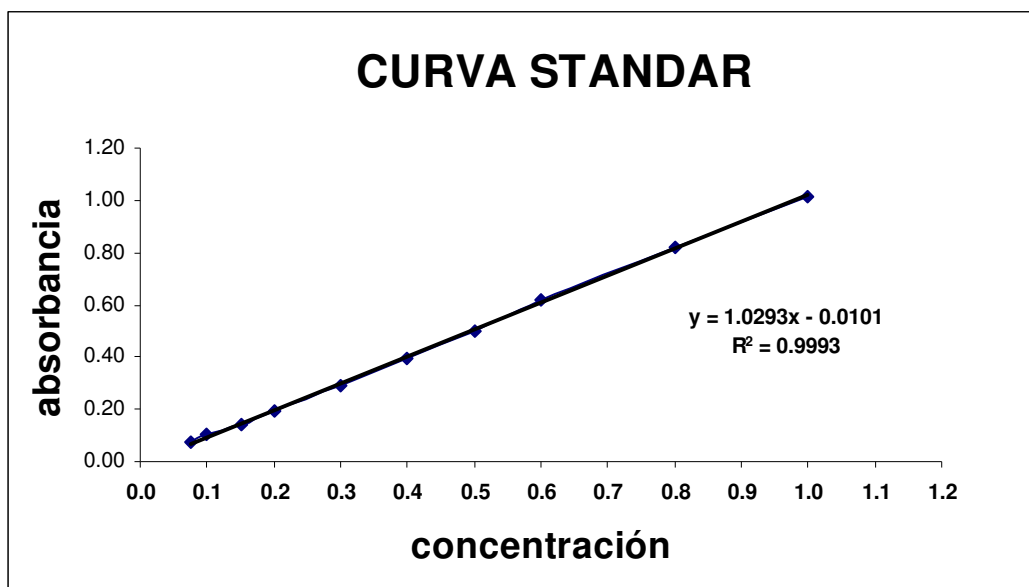
#### IV.2.1 Curva Estándar

Uno de los pasos fundamentales para tener un buen análisis y una cuantificación buena de los azúcares reductores es hacer una buena curva estándar (Figura IV.3), con el reactivo recién preparado. Se realizó según método mencionado, donde le eje de la X = Concentración de contenido de azúcar reductor y el eje Y = Absorbancia, donde la ecuación resultante fue:

$$Y = 1.0293x - 0.0101.$$

$$R^2 = 0.9993$$

Y de ahí poder hallar por interpolación y conversiones el contenido de azúcares reductores. Se tuvo que variar el protocolo inicial, ya que algunos cultivares nativos presentan niveles muy bajos de azúcares reductores, y al cuantificarlos en el espectro tenía lectura cero, y lo que se hizo fue concentrar mas y así tener una lectura adecuada.



**Figura IV.3** Curva estándar para la cuantificación del contenido de azúcares reductores en los cultivares nativos de papa.

#### IV.3 Comparación entre Color de Fritura y contenido de Azúcares Reductores

En los gráficos podemos ver que en general hay una relación directa entre la fritura y el contenido de azúcares reductores, y hemos hecho los gráficos por especie, así que tenemos el grupo más numeroso *S. andigena* (4X), con 16 cultivares, *S. stenotomum* con 10 cultivares (2X), *S. goniocalyx* con 9 cultivares (2X), *S. chaucha* con 3 cultivares (3X), *S. juzepzuckii*, con 1 cultivar (3X), y *S. curtilobum* con 1 cultivar (5X). El comportamiento de los grupos mencionados no da como resultado que las especies *S. stenotomum*, *S. goniocalyx*, ambas diplóides son las que mejores resultados tienen, así como también la *S. chaucha*, con bajos valores en contenido de azúcares reductores y buena calidad de fritura y poca absorción de aceite.

Hay una estrecha relación entre el color de la fritura y el contenido de azúcares reductores. Sabemos que a mayor contenido de azúcares reductores el color de fritura será más oscuro, y esto lo podemos apreciar en el Gráfico 5, 6, 7 respectivamente, sobre todo se ve que en el tratamiento de 90 días a temperatura 4 °C los niveles son altos.

Podemos ver que en Gráfico 5 que hay una alta correlación entre el contenido de azúcares reductores y fritura, en los tres tratamientos: 10 días después de la cosecha la correlación fue de  $r = 0,83$ . En éste tratamiento el contenido mas alto de azúcares reductores correspondió a los cultivares: 702477 “Yana Puma Maqui”, 701014 “Huataqui” y 703787 “Negritas” con 1,00, 0,564 y 0,553 g/100g de muestra fresca respectivamente.

En el segundo tratamiento a 90 días después de la cosecha a temperatura ambiente, el grado de correlación fue de  $r = 0,68$ . (Anexo VII). En este tratamiento se da el caso “raro” en 703698 “carpacho azul” (Gráfico 6); esto es un caso inverso, es decir su fritura es buena con 1.5 pero su valor de contenido de azúcar es muy alto con 0,912g/100g de muestra fresca. En este tratamiento también se dan los valores más altos en el contenido de azúcares reductores y en especial en el grupo de andígenas

donde: 702477 “Yana Puma Maqui” y 703787 “Negritas” con 1,477 y 0,986 g/100g de muestra fresca respectivamente.

Y finalmente en el tercer tratamiento 90 días almacenada a 4 °C, el grado de correlación fue de  $r = 0,73$ . En este tratamiento se dieron los grados máximos de azúcares reductores correspondieron a los mismos del tratamiento anterior: 702477 “Yana Puma Maqui”, 703787 “Negritas” con 1,558 y 1,303 g/100g de muestra fresca respectivamente, en este tratamiento al igual que en el anterior el 703698 “carpacho azul” (Gráfico 7), presentó también un grado de fritura muy bueno con 1.5 en la escala de colores, pero su azúcar muy elevado con 1,120 g/100g muestra fresca.

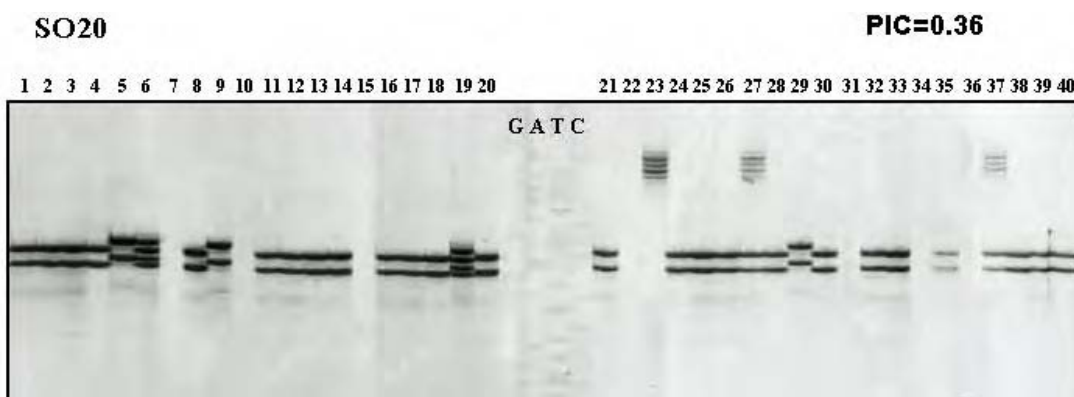
#### **IV.4 Comparación entre: Contenido de Materia Seca y Absorción de aceite en el proceso de fritura**

El contenido de materia seca esta estrechamente relacionada con la absorción de aceite en el proceso de fritura, la correlación es inversa y por lo tanto los valores son negativos es decir; a mayor contenido de materia seca menor absorción de aceite y esto se puede apreciar en los Gráficos 8, 9 y 10.

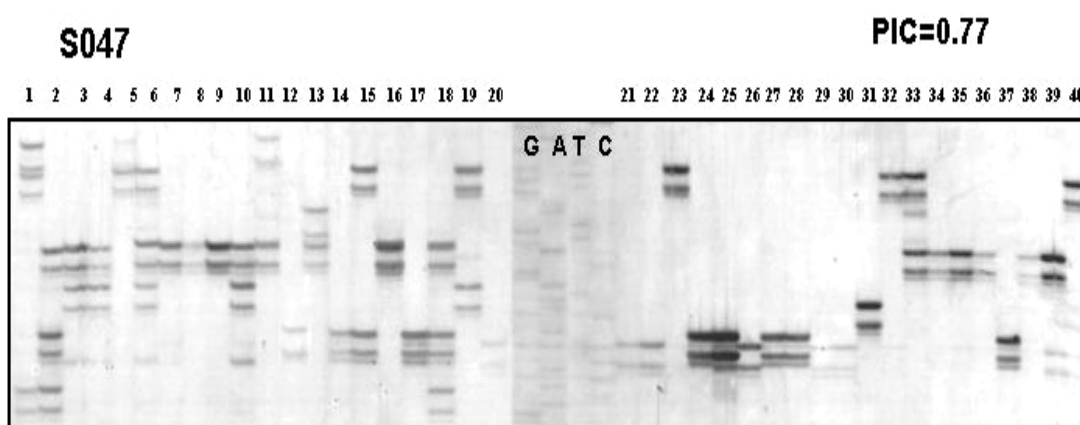
La materia seca en general no varió drásticamente en los tratamientos respectivos, pero hay un ligero incremento en la absorción de aceite en el segundo tratamiento 90 días almacenadas a la temperatura ambiente (Tabla IV.1). Los grados de correlación son negativos entre contenido de materia seca y absorción de aceite en los tres tratamientos y fueron:  $r = -0,52$  (10 días después de la cosecha),  $r = -0,56$  (90 días almacenada a temperatura ambiente) y  $r = -0,53$  (90 días almacenada en cámara fría a 4 °C), siendo ellos significativos (Anexo VII) y vemos en los gráficos 8, 9 y 10, como dos puntos que se contraponen por que son inversamente proporcionales.

#### IV.5 Obtención y caracterización de los marcadores moleculares

Se analizaron 18 loci microsatélites, los cuales fueron seleccionados por estar presentes en los 12 cromosomas de papa, tener una posición en el mapa y que tienen buena calidad en la amplificación. Estos mostraron patrones de bandas (alelos) de gran calidad y alta resolución en geles de poliacrilamida y por lo tanto el peso pudo determinarse sin problema.



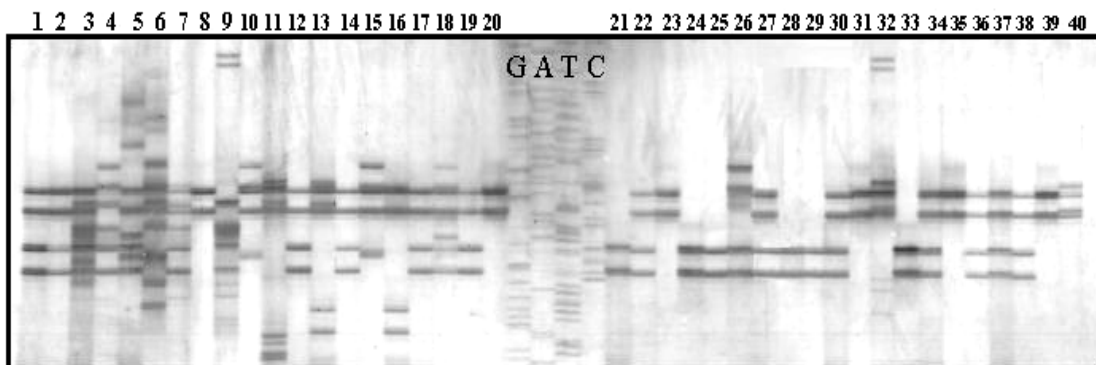
**Figura IV.4** Patrón de bandas obtenido luego de la amplificación con el par de iniciadores S020 (STM1031) de 40 cultivares de papa nativa tolerantes al endulzamiento al frío, donde el índice de contenido Polimórfico PIC= 0.36, donde GATC estándar de peso molecular.



**Figura IV.5** Patrón de bandas obtenido luego de la amplificación con el par de iniciadores S047 (STM0030) de 40 cultivares de papa nativa tolerantes al endulzamiento al frío, donde el índice de contenido Polimórfico PIC= 0.77, donde GATC estándar de peso molecular.

**S052**

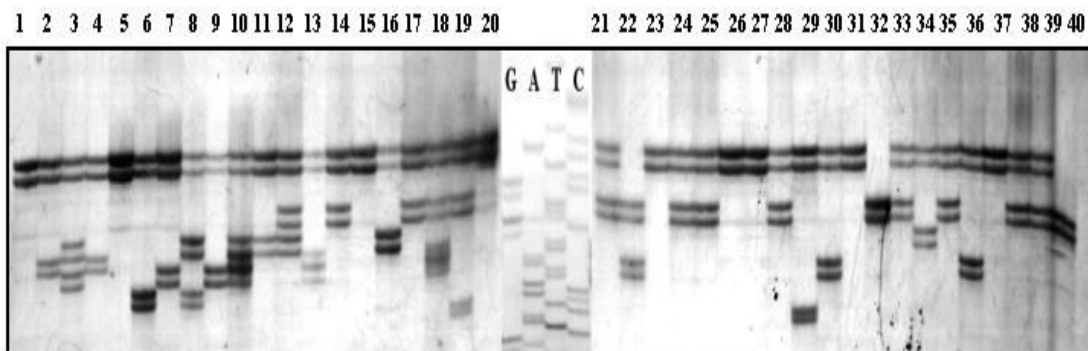
**PIC=0.73**



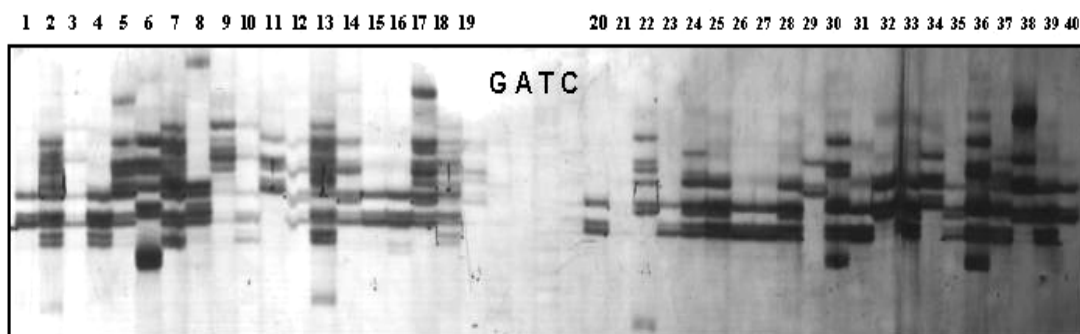
**Figura IV.6** Patrón de bandas obtenido luego de la amplificación con el par de iniciadores S052 (STM0031) de 40 cultivares de papa nativa tolerantes al endulzamiento al frío, cuyo Índice de contenido Polimórfico PIC= 0.73, donde GATC estándar de peso molecular.

**S069**

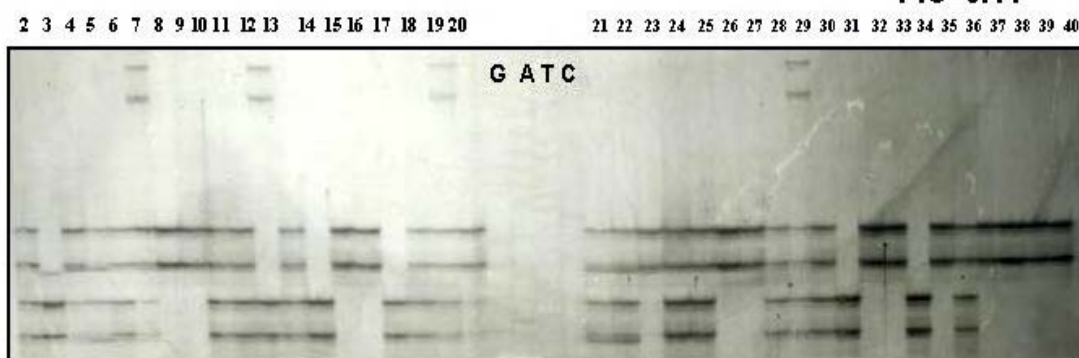
**PIC=0.71**



**Figura IV.7** Patrón de bandas obtenido luego de la amplificación con el par de iniciadores S069 (STWAX-2) de 40 cultivares de papa nativa tolerantes al endulzamiento al frío, cuyo Índice de contenido Polimórfico PIC= 0.71, donde GATC estándar de peso molecular.

**S081****Pic=0.79**

**Figura IV.8** Patrón de bandas obtenido luego de la amplificación con el par de iniciadores S081 (STM1104) de 40 cultivares de papa nativa tolerantes al endulzamiento al frío, cuyo Índice de contenido Polimórfico  $PIC = 0.79$ , donde GATC estándar de peso molecular.

**S106****PIC=0.44**

**Figura IV. 9** Patrón de bandas obtenido luego de la amplificación con el par de iniciadores S106 (STM2022) de 39 cultivares de papa nativa tolerantes al endulzamiento al frío, cuyo Índice de contenido Polimórfico  $PIC = 0.44$ , donde GATC estándar de peso molecular

En cada genotipo la amplificación de loci específicos revela la presencia de uno o más alelos por locus, según el grado de ploidía. Por eso vemos dos, tres, cuatro hasta 5 alelos por locus; ya que tenemos cultivares nativos con estas ploídías. Una elección no arbitraria de un número significativo de secuencias microsatélites, permite una distribución uniforme sobre el genoma, mediante la amplificación de dichas secuencias y su posterior resolución, podemos identificar en este nuestro caso al cultivar nativo (huella digital o “fingerprint”).( Gupta, P. K. *et al*,1996)

#### IV.5.1 Identificación de alelos nulos

De los 18 iniciadores analizados, el iniciador S020 fue el único que presentó los llamados “alelos nulos”, es decir ausencia de bandas en los cultivares: 702915 Adg. “Puca trombos”, 703488 Adg. “Challina”, 703279 Gon. “Unknow”, 701633 Stn. “Pirampo”, 703421 Stn. “Poluya”, 703698 Stn. “Carpacho azul” (Figura IV. 10)

La ausencia de bandas en algún genotipo se debe a la ocurrencia de mas de un alelo nulo (el número depende de la ploidía)



**Figura IV.10** Alelos nulos.- Iniciador S020 en la foto se aprecia tres genotipos que no amplificaron con el iniciador S020: 702915 Adg, 703488 Adg y 703279 Gon.

#### IV.5.2 Tamaño de los alelos

El rango de productos amplificados o el tamaño de los alelos se determina en pares de bases bp y nuestro rango estuvo entre 75bp para el locus S042 y 298bp para el locus S020 según Tabla IV.5, para los 18 loci microsatélites analizados. Encontramos cuatro iniciadores multiloci S011, S042, S095 y S101 cada uno de ellos amplificaron 2 regiones denominadas “a” y “b” cuyos tamaños lo podemos ver en la Tabla IV.6, vemos que el tamaño del locus S095b esta dentro del rango del S095a como un sub grupo interno.

**Tabla IV.5** Tamaño de los productos SSR amplificados

<b>Locus</b>	<b>Tamaño de alelos ( p/b)</b>
S011	213A - 93G
S020	298C - 267C
S024	142T - 115T
S029	268C - 231T
S036	181A - 168A
S042	95G - 75A
S047	167T - 130G
S051	269T - 243G
S052	205T - 155T
S056	204C - 184A
S069	243A - 221A
S081	182T - 164A
S084	263G - 212T
S089	211G - 153A
S095	201T - 169C
S101	198C - 142T
S104	172G - 149T
S106	243A - 185A

**Tabla IV.6** Locus “a” y “b”

<b>Locus</b>	<b>Tamaño de alelos ( p/b)</b>
S011a	213A - 155T
S011b	103T - 93G
S042a	92C - 87C
S042b	79G - 75A
S095a	201T - 169C
S095b	190A - 183A
S101a	198C - 154A
S101b	147G - 142T

#### **IV.5.3 Determinación PIC y Riqueza alélica en cada locus**

La riqueza alélica o el número total de alelos encontrado con los 18 iniciadores microsatélites analizados está representado por 138 alelos, donde el número de alelos por locus varió desde 3 (locus S020) a 13 (locus S011). Con un promedio 7.67 alelos por locus.

El índice de diversidad fue medido por el PIC (Contenido de Información Polimórfica) y fue calculado para cada iniciador, en una población total de 40 cultivares nativos. Los valores del índice de diversidad varían desde 0.361 para el iniciador S020 hasta 0.848 para el iniciador S084 (Tabla IV.7).



**Tabla IV.7** Contenido de información polimórfica (PIC) y Riqueza alélica.

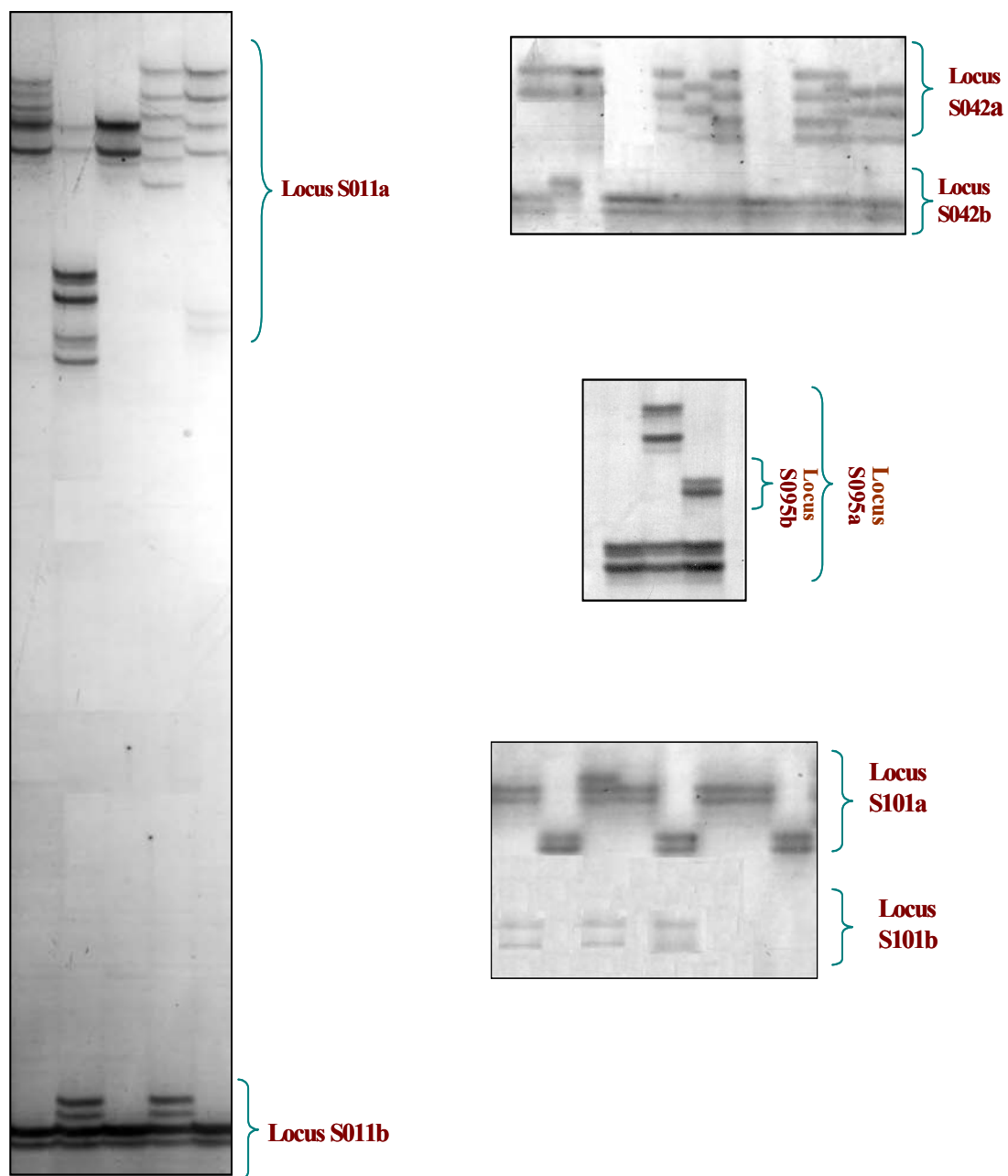
<b>Locus</b>	<b>Indice de diversidad PIC</b>	<b>Riqueza alelica</b>
S011	0.847	13
S020	0.361	3
S024	0.813	10
S029	0.753	7
S036	0.684	5
S042	0.755	7
S047	0.773	9
S051	0.765	9
S052	0.730	11
S056	0.420	5
S069	0.710	7
S081	0.786	8
S084	0.848	12
S089	0.648	8
S095	0.597	5
S101	0.773	8
S104	0.779	7
S106	0.561	4
Promedio:	0,700	Total : 138

#### **IV.5.4 Casos de iniciadores multi-loci**

Como mencionamos anteriormente encontramos cuatro iniciadores multiloci: S011, S042, S095 y S101 cada uno de ellos amplificaron 2 regiones denominadas “a” y “b”. Al hacer el Índice de diversidad por separado (Índice de “a” y “b”); tenemos que el PIC de estos es mas bajo en comparación por el PIC total. (Tabla IV.8 y Figura IV.11)

**Tabla IV.8** Iniciadores multiloci.

<b>Locus</b>	<b>Indice de diversidad PIC</b>	<b>Riqueza alelica</b>
S011a	0.820	9
S011b	0.439	4
S042a	0.595	3
S042b	0.553	4
S095a	0.414	3
S095b	0.320	2
S101a	0.802	5
S101b	0.240	3



**Figura IV.11** Iniciadores multiloci: Locus S011, Locus S042, Locus S095, Locus S101.

#### IV.5.5 Cultivares que exceden en ploidía

Dentro de las ventajas que tienen el uso de marcadores microsatélites en papa sobre otros sistemas de marcadores dominantes, es su capacidad de este de reflejar la ploidía de los genotipos. En nuestro estudio usamos 40 cultivares nativos con ploidías de: 2x, 3x, 4x y 5x, vemos que en muchos casos que han presentado alelos de mas es decir que han excedido su ploidía. De todos los 18 iniciadores estudiados, los cultivares que excedieron en su ploidía se resume en la Tabla IV.9.

**Tabla IV.9** Cultivares nativos que presentaron exceso de ploidía con los 18 pares de iniciadores.

Codigo CIP	Ploidia	LOCUS						
		S024	S047	S051	S052	S081	S084	S104
704327-Cha	3x	4				4		
705543-Cha	3x	4	4	4	4	4	5	
701633-Stn	2x							3*
703287-Stn	2x							3*

\*Es posible que el iniciador S104 sea un multi-loci.

Considerando los alelos multi-loci como locus separados o diferentes el resultado general es que solo 4 genotipos nativos dieron más alelos de lo esperado para el nivel de ploidía que presentan. De estos dos cultivares nativos *S. chaucha* han presentado exceso de alelos, sobre todo el cultivar nativo 705543 “Yana warmi”, en seis locus de los 18 analizados, el otro 704327 “Color unkuna” exceso de ploidía en dos locus y dos cultivares nativos: 701633 “Pirampo” y 703287 “Cceccorani” ambos *S. Stenotomum*, ambos en un solo locus.

#### IV.5.6 Promedio de clases alélicas por genotipo y por ploidía

El promedio varió desde 28.5% para los diploídes hasta 47.0% para los pentaploídes, con un promedio general de clases alélicas de 35.05%. (Tabla IV.10)

**Tabla IV.10** Promedio de clases alélicas por genotipo.

Grupo	Número de genotipos	Promedio de clases alélicas por genotipo (%)
Diploides	20	28.5
Triploides	3	45.0
Tetraploides	16	40.6
Pentaploides	1	47.0
Todos	40	35.05

#### IV.6 Análisis mediante NTSYS

Mediante la taxonomía numérica podemos tener una idea aproximada acerca de la diversidad genética de estos cultivares, usando para ello el programa NTYSYSpc 2.02h.

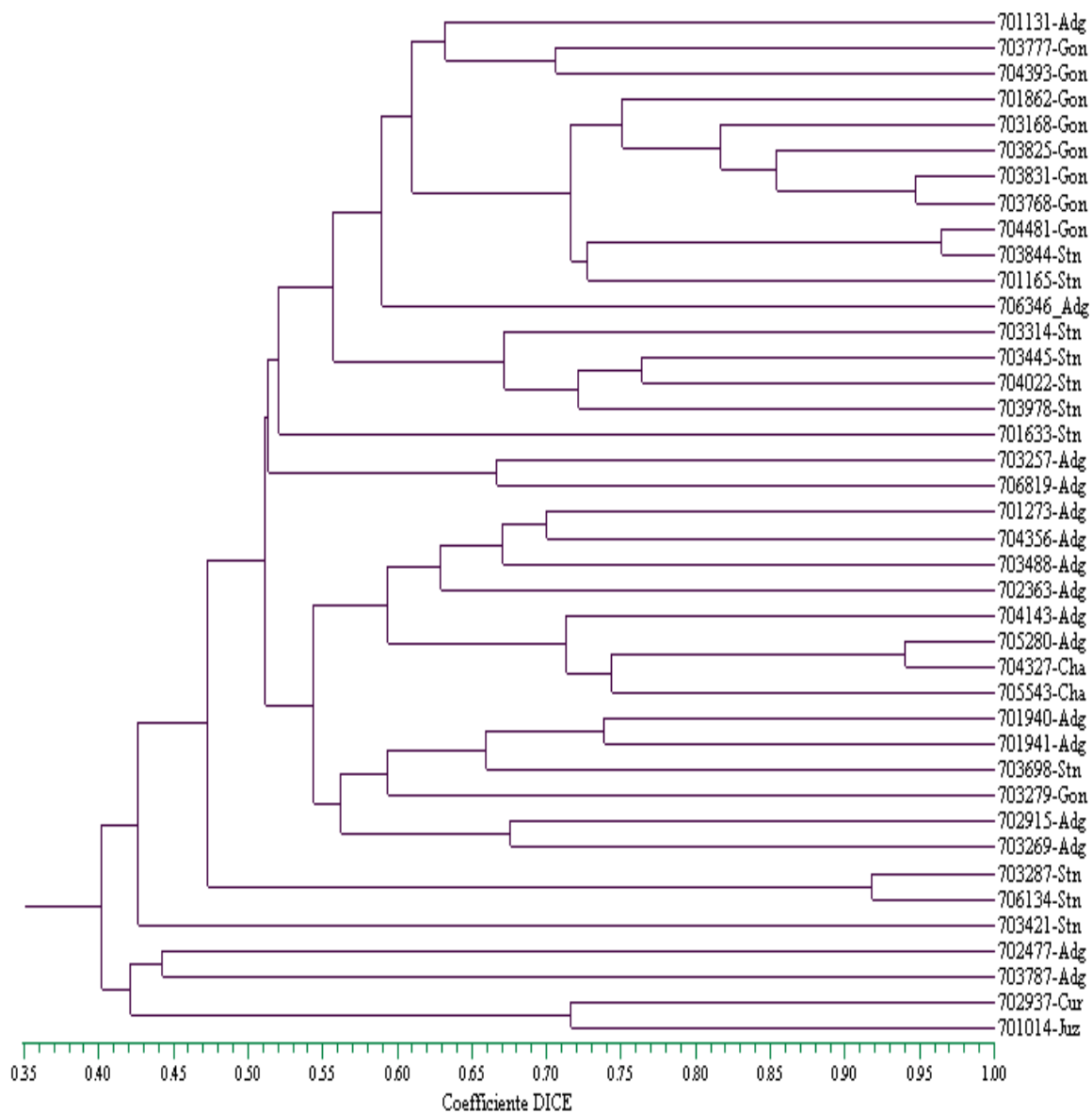
Se hizo un análisis de agrupamiento, obteniéndose para el sistema de marcadores SSR un valor de similitud que varia desde 0.262 a 0.964 (Anexo X) para los 40 cultivares de papa nativa. Y con estos datos se llevo a cabo la construcción del árbol por UPGMA (NTYSYSpc 2.02h) (Figura IV.12). El valor mas bajo de similitud de 0.262 se dio entre los cultivares nativos: 706346 (Adg) “Unknown” con 701014 (*S. juzepczukii*) “Huataqui” y el valor más alto de similitud de 0.964 se dio entre los cultivares nativos: 703844 (*S. stenotunum*) “Añil papa” con 704481 (*S. gonicalix*) “Amarilla”.

En el dendograma se puede diferenciar claramente tres grupos: *S. gonicalix*, *S. stenotunum* y *S. andígena*, a su vez estos tenían mas cultivares por especie.

Por otro lado vemos que *S. andígena* está presente a lo largo del dendograma pero vemos un grupo mayoritario de 10 andígenas (de 16 en total) que involucran a las dos únicas *S. chaucha*: 704327 “Color Unckuna” y 705543 “Yana Warmi”

En la parte final del dendograma se agruparon los cultivares *S. juzepczukii* 701014 “Huataqui” y *S. curtilobum* 702937 “Laram Ocucuri o Choquecito” ambas son papas amargas y al ser agrupadas por el árbol las ponen aisladas en la parte final siendo estas las mas distantes en similaridad.

Si hacemos un corte transversal en el dendograma a la altura de grado de similaridad igual a 0.80, vemos que hay 11 cultivares nativos en 4 sub árboles, pero que tienen la particularidad que estos son excelentes para el procesado con contenido de azúcares reductores muy bajos y son: 701862 “Amarilla Tumbay”, 703168 “Puca Pishgush”, 703825 “China Runtush”, 703831 “Pampuna”, 703768 “Huayro Roja”, 704481 “Amarilla” , 703844 “Añil Papa”, 703287 “Azul Sonq’o” o “Q’eqorani”, 706134 “Cceccorani” , 705280 “Murunguilla”, 704327 Color Unckuna, 705543 “Yana Warmi” .



**Figura IV.12** Árbol generado por las medias aritméticas no ponderadas (UPGMA) , usando el coeficiente de similitud DICE; Mostrando las diversas asociaciones existentes del marcador molecular SSR; de 40 cultivares nativos de papa tolerantes al endulzamiento al frío.

## V DISCUSIÓN

### V.1 Materia seca

El contenido y la composición de materia seca son muy variables, existen factores que afectan su contenido, como la variedad, clima, época de siembra, tipo de suelo, prácticas culturales, y la presencia de plagas y enfermedades. Según Vásquez 1989, en el Perú existen variedades nativas que alcanzan hasta 34.8% en el contenido de materia seca.

En este trabajo encontramos 10 variedades nativas con muy altos contenidos de materia seca sobre 30% del peso total del tubérculo, lo que nos indica que estas papas son muy buenas para el procesado en éste caso para hojuelas, ya que de las características que debe tener un tubérculo es buena cantidad de materia seca. Normalmente, el contenido en materia seca determina el rendimiento del producto terminado. Así por ejemplo, aumenta el rendimiento de las hojuelas por menores pérdidas cuantitativas de evaporación de agua, mientras que disminuye la retención de aceite en la fritura. Esto es importante, tanto para la economía como para la nutrición fisiológica.

Alto contenido de sólidos o materia seca (MS) que influye en la consistencia, textura y harinosidad., porque determina directamente el rendimiento, la menor absorción de aceite, menor tiempo de proceso de fritura, ya que la evaporación de agua sería más rápido y por consiguiente la reducción de precios (Bonierbale *et al.*, 2000). Por lo dicho anteriormente podemos afirmar que mayor MS sería beneficioso para la salud y se puede bajar la temperatura de fritura y por lo tanto hay un gran ahorro de energía.

En el estudio vemos que hay un incremento ligero de materia seca para los tratamientos de 90 días almacenada a temperatura ambiente y 90 días a temperatura

4°C, (Gráfico1) esto quizá podría deberse a que nosotros usamos el método de liofilización, ya que contábamos con poco material, además nos servía para utilizarlos para la cuantificación de azúcares reductores, y no tomamos en cuenta la humedad. Y esto tendría una explicación lógica ya que cuando cuantificamos del contenido de materia seca por el método liofilizado, pesamos el material en su respectivo tratamiento, o sea después de transcurrido el periodo de 90 días pesamos el material 100gr aprox. y lo dejamos a liofilizar por 10 días (después de los 90 días ya hubo pérdida de peso, por pérdida de agua, respiración u otros factores) no así comparando con el peso inicial que vendría hacer 10 días después de cosecha, ya que hay pérdida de peso por las funciones fisiológicas del tubérculo.

Se atribuye pérdidas del peso durante almacenaje a las pérdidas en materia seca con la respiración, pérdida de agua con la evaporación, la pérdida de brotes y el daño por enfermedades fungicidas y bacterianas. Burton *et al.*, (1992), afirman que hay pérdida del contenido materia seca en el almacenamiento de 0.3% en un periodo de 30 días y de 0.6% en un periodo de 6 meses en tubérculos de papa.

Según Moreno (2002), el nivel de contenido en materia seca está limitado. Así, a mayor contenido en materia seca aumenta la tendencia a formar manchas azules en los tubérculos. Contenidos altos de materia seca dan lugar a productos con texturas duras y astillosas; contenidos demasiados bajos dan lugar a productos con grandes deformaciones en la elaboración de hojuelas. También afirma que el contenido de materia seca es 25% (papa blanca). No habiéndose encontrado registros de cantidades “ideales” de contenido de materia seca para cultivares nativos, ya que estos es su gran mayoría sobrepasan fácilmente los 25% del contenido de materia seca.

En nuestro caso las variedades que presentan alta cantidad de materia seca por encima de 30% dieron buenos resultados en textura y sabor, no se presentaron las manchas azules, lo que se observó que algunos cultivares nativos presentan alto contenido de materia seca y no es buena en fritura por el color negruzco que



presentaron, ésto sugiere que estas variedades se podrían aprovechar como materia prima para almidones u otros derivados.

## **V.2 Absorción de aceite**

El contenido de absorción de aceite es muy importante para los procesadores en hojuelas. Si bien es cierto que hay excelentes cultivares en el proceso de fritura, pero absorben gran cantidad de aceite y esto no está recomendado para ser comercial. Se podría buscar una metodología más adecuada para hacer que estos cultivares absorban menos aceite, buscando una temperatura más adecuada, para su fritura y hacer el secado al horno podría ser una alternativa.

La absorción de aceite está muy relacionada con el contenido de materia seca y dan un mayor rendimiento en hojuelas (Gould, 1989). La alta concentración de aceite después de la fritura en la hojuela es otro punto a evaluar, dentro del procesado y se consideran inaceptables por encima de 30% del peso total de hojuela.

Al parecer, la absorción del aceite aumenta cuando la temperatura de fritura es menor, es decir, es inversamente proporcional para los contenidos de agua iguales. Esto sugiere que haya un efecto del tiempo y de la temperatura que fríen en la absorción del aceite en las hojuelas de papa. La mayor absorción de aceite se da cuando sacamos las hojuelas del aceite en la fase de “refrescamiento” y se da en la región microporosa de la corteza. (Bouchon *et al*, 2003)

## **V.3 Fritura**

El método de fritura utilizado es el de inmersión, donde el alimento recibe en toda su superficie el mismo tratamiento térmico, lo que le confiere un color y aspecto uniformes.

La fritura es una operación unitaria destinada a modificar las características organolépticas del alimento, consiguiendo también un efecto conservador por la destrucción térmica de los microorganismos y enzimas presentes en el mismo y por la reducción de la actividad de agua en su superficie, o en toda su masa, en el caso de los alimentos de tipo de papa.

El objetivo de la fritura profunda es producir alimentos para consumo inmediato o para el procesamiento adicional, con rangos de temperatura del aceite desde los 130°C a 200°C (Farkas *et al.*, 1992), donde las temperaturas más utilizadas varían entre 140°C a 180°C.

Esto nos indica que si procesamos hojuelas de papas almacenadas en frío de 2°C a 4°C, habría un menor encogimiento, disminución de enfermedades, un amplio potencial para el mercado y la eliminación de la necesidad de prolongar el estado de dormancia mediante químicos (Sowokinos, 1989). Las papas nativas se han destacado por su versatilidad en el procesamiento de diversos productos. Actualmente se está estudiando que tan aceptable puede ser la utilización en comidas, ya sea en hojuelas u otros productos. En el Perú, según la FAO se llega a procesar solo el 2% de la oferta nacional de papa <http://www.portalagrario.gob.pe>

Los principales factores de calidad de este producto son: color parejo, sabor, textura, consistencia, "crujencia", contenido de absorción de aceite. El color de las hojuelas está determinado por el contenido de azúcares reductores en las papas. Si este contenido es bajo, obtendremos hojuelas doradas de buena calidad, sin embargo, un excesivo contenido de azúcares reductores en las patatas provocará una coloración marrón oscura en las hojuelas, que los hará inaceptables tanto por su color como por su sabor. La evaluación del color se efectúa de acuerdo con una tabla de colores de 1 a 5 puntos (1 = claro, 5 = oscuro) de la hojuela según la "Potato Chip and Snack Food Association" de los Estados Unidos (Douches, *et al.*, 1994).

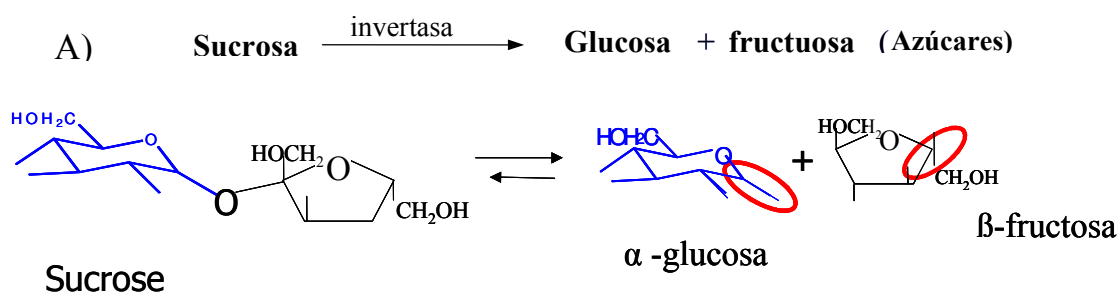
La propiedad organoléptica del color es de mucha importancia sobre todo en las industrias de hojuelas de papa, ya que estas características si influye en la calificación para su aceptación del consumidor. Los azúcares reductores y aminoácidos libres son necesarios para formar los N-glicosalamidas sustituidas, cuya transformación y polimerización originará los pigmentos melánicos con distintos matices: beige claro, pardo, negruzco y hasta negro. Por tanto, no se deben procesar papas con un contenido en azúcares reductores mayor del 0,2-0,3 %, factor imprescindible en la variedad de papa. El sabor de las hojuelas está influenciado también por el tipo de aceite usado y por las operaciones de salado y condimentado cuando éstas se lleven a cabo. También afecta al sabor un excesivo contenido en aceite. Si las papas tienen un alto contenido de materia seca y son cortadas lo más lisas posible, absorberán menos aceite. La consistencia o textura de las hojuelas está fundamentalmente afectada por las características de la variedad de papa y depende de la organización celular.

#### **V. 4 Azúcares reductores**

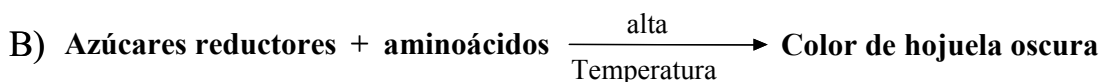
El almacenamiento de las papas por largos periodos de tiempo es un aspecto importante para la comercialización. El mantenimiento de las papas con bajos niveles en azúcares reductores para el procesado, es uno de los factores importantes en la calidad final del producto. Sin embargo, las bajas temperaturas, causan la degradación de almidón a azúcar y al aumento del dulzor en los tubérculos (van Es y Hartmans, 1987; Morell y Rees, 1986; Rees *et al.*, 1981; Ross y Davies, 1992)

Por eso se requiere guardar estos productos a temperaturas menores de 4°C para reducir el crecimiento del brote, pérdida de humedad y la incidencia de alguna enfermedad durante el almacenaje, sin embargo los azúcares reductores aumentan por la degradación del almidón por la enzima invertasa sintetasa en sucrosa y de ahí a fructosa y glucosa que son los azúcares reductores más importantes que van a dar el color final en las hojuelas de papa (Figura V.1).

Estos azúcares reductores tienen un grupo aldehído que reacciona con los grupos amino de los aminoácidos presentes vía la Reacción de Maillard (Gray y Hughes, 1982; Storey and Davis, 1992; Dills, 1993), dando como resultado hojuelas marrones en la fritura.



#### Reaccion de Maillard



**Figura V.1** A).- Síntesis de Glucosa y Fructuosa a partir de a Sucrosa B).- Reacción de Maillard. (Duffus y Duffus, 1984)

Una de las estrategias es seleccionar a los cultivares por el tipo de color de hojuela y de ellas hacer análisis en sus progenies en diferentes ambientes. El contenido de azúcares reductores de los tubérculos varía según su estado fisiológico, año agrícola, procedencia de la zona de cultivo, y es por eso que el rango del contenido de azúcares reductores va desde 0,02 a 0,200g/100g de muestra fresca y estos serán de coloración adecuada. Valores superiores a 200mg% son hojuelas de coloración intensa y rechazada por los consumidores y el color se asocia a un sabor a quemado (Ordóñez, 1980).

Para mantener un nivel aceptable de azúcares reductores para un buen procesado las papas se almacenan a 10°C, pero a ésta temperatura es necesario aplicar inhibidor de brotamiento, pero actualmente esta creciendo la preocupación de las

personas por el uso de productos químicos en el suministro de alimentos. El uso de estos productos se está prohibiendo en muchos países, incluso se está tratando el caso en USA, por lo tanto los cultivadores y procesadores de papa podrían perder el uso de este producto químico y de otros productos químicos en un futuro cercano. Una alternativa o estrategia sería encontrar variedades de papas resistentes al frío es decir que no acumulen azúcares reductores cuando está en la cámara fría (Douches, 1994)

Una meta primaria es descubrir la naturaleza bioquímica y molecular relacionada con los mecanismos que regulan la post cosecha y el endulzamiento inducido al frío de los cultivares nativos de papa. (Sowokinos, 2001)

Como podemos ver nosotros tenemos un grupo selecto de 20 cultivares nativos con niveles bajos de azúcares incluso después de almacenado en frío a 4°C, da una excelente fritura en los tres tratamientos. Destacamos el grupo de las diploídes que resultaron muy estables para los tres tratamientos. Estos cultivares habían sido previamente seleccionados por su buena calidad de fritura en campañas anteriores y en este trabajo mantuvieron su calidad de fritura.

La regulación de conversión de almidón en azúcares reductores durante la producción y el almacenamiento en frío de papa, el brotamiento y el alto contenido de aceite (30-40%) en los productos procesados por fritura, son los principales desafíos científicos para la industria de procesamiento a las que el mejoramiento genético puede contribuir. Los factores que controlan estos aspectos están relacionados con los metabolismos de carbohidratos, principalmente el almidón y los azúcares. (Bonierbale, 2000)

Estas variedades son muy poco conocidas por los propios peruanos centrándose solo en las papas amarillas o huaycos que se vende en el mercado. Tenemos un gran potencial, podríamos abrir mercado para en un futuro no muy lejano éstas papas nativas y hacerlas exportables. Pero debemos que tener un plan estratégico para disponer de un

mercado ya sea nacional o internacional para poder abastecer la demanda, ya que éstos productos son de altura por encima de los 3200msnm donde la agricultura se da en espacios reducidos con condiciones de clima desfavorables.

## **V. 5 Caracterización de los marcadores moleculares**

Estos marcadores se caracterizaron por su alto nivel de polimorfismo y reproducibilidad. El análisis genético evidenció el poder de los SSRs en la diferenciación y asociación de variedades estrechamente emparentadas. Este trabajo provee de una herramienta molecular confiable y reproducible para el análisis de variedades de papa nativas de importancia comercial y en planes de mejoramiento. En cada genotipo la amplificación de loci específicos revela la presencia de uno o más alelos por locus, según el grado de ploidía de la especie y según sea el individuo heterocigoto u homocigoto.

### **V.5.1 Alelo nulos**

Se habla de alelos nulos o silenciosos cuando un alelo no puede ser amplificado, siendo una de las principales causas posibles sería una mutación en el punto de hibridación del cebador; ese alelo no amplifica y el individuo está catalogado como homocigoto (Dawson *et al.*, 1997)

Una posible causa sería la mutación en el sitio de hibridación de algunos de los iniciadores o la pérdida de región microsatélite incluyendo a las regiones que la flanquean.

Estas son llamadas mutaciones puntuales simples o múltiples sustituciones nucleotídicas, inserciones, deleciones de fragmentos de ADN, lo que impide la amplificación (Loyola, 1966 y Karhu, 2001)

### **V.5.2 Alelos que exceden en ploidía**

El número de alelos distintos que han presentado para un locus podría alcanzar el nivel de ploidía en caso de maximizar su heterocigocidad, pero jamás podría excederlo (Ghislain *et al.*, 2000)

De lo dicho anteriormente sólo habría dos posibilidades para locus que exceden en ploidía, la primera podría ser que el iniciador amplifique mas de un locus, es decir que sea multiloci (pueden ser dos, tres o más locus distintos generado por un solo iniciador) esto puede deberse a que la región microsatélite podría estar duplicada (Lefort *et al* 1999).

La otra explicación sería que se trataría de accesiones que no corresponde a dicha especie y que pueda haber un error de clasificación taxonómica de algunos cultivares nativos. Otra posibilidad podría ser un error humano de colección, quiere decir que a la hora de coleccionar hojas para la extracción de ADN, se obtuvo hojas de otro cultivar distinto.

### **V.5.3 Alelos multiloci**

Una de las ventajas que presenta los microsatélites como marcadores moleculares es que ellos pueden revelar el número de alelos que presentan los genotipos (Morgante y Olivieri 1993; Powell *et al.*, 1996).

De los genotipos estudiados algunos presentaron más alelos de lo esperado de acuerdo a la ploidía que presentan, ya que han sido reportados por el curador. Y esto es debido fundamentalmente a que los iniciadores: S011, S042, S095 y S101 resultaron ser multiloci.

Así encontramos que el iniciador S011 amplifica dos regiones microsatélites bien diferenciadas tanto por el peso molecular en pares de bases (pb) así como también en el producto de amplificación (fenotipo). Por estas razones a estas dos regiones se las reconoce como dos loci diferentes, nominándolos S011a y S011b.

El iniciador S042 amplifica dos regiones, la cual denominamos locus S042a y locus S042b, el producto de amplificación presenta dos loci diferentes en el fenotipo de sus bandas, las bandas de mayor peso son más grandes en comparación con las de menor peso molecular, pero hay un estrecho margen que los separa.

El iniciador S095 también amplifica dos regiones, podemos diferenciarlas por el fenotipo de sus productos de amplificación, dando bandas mas estrechas que las otras, a las que se han reconocido como los locus S095a y locus S095b. En este caso las dos regiones no están bien diferenciadas ya que el locus S095b esta dentro del locus S095a.

En el caso del iniciador S101 genera dos tipos de bandas que son diferentes, es decir en sus productos de amplificación hay una ligera diferencia, y así podemos diferenciar dos tipos de alelos; y lo denominamos el locus S101a y el locus S101b.

#### **V.5.4 Riqueza alélica**

Distribuciones de frecuencias alélicas en los cultivares nativos de papa presentan una propia combinación alélica llamada genotipo. La interacción de factores ambientales muy adversos por encima de los 3000 msnm, de estos cultivares nativos determinan que cultivares van a sobrevivir y por lo tanto que alelos o combinaciones alélicas prevalecerán en su genoma.



Los 18 pares de iniciadores microsatélites utilizados, es un número significativo para una distribución uniforme sobre el genoma (abarca los 12 cromosomas de la papa), que permite, mediante la amplificación de dichas secuencias y su posterior resolución, obtener una identificación del individuo o huella digital (“fingerprint”). La identificación del individuo queda descrita por el conjunto total de alelos obtenido para cada uno de ellos, llamado patrón alélico.

La comparación de patrones alélicos, mediante coeficientes de similaridad, permite establecer grupos de individuos con características génicas similares (Pejic *et al.*, 1998). Posteriormente dichos grupos, suelen ser representados mediante un dendrograma. Un dendrograma (dendron: árbol y diágramma: diseño) es una descripción del grado de similaridad génica o distancia entre individuos pertenecientes a una misma especie o a distintas especies, donde cada punto de ramificación representa el valor de similaridad o distancia génica entre los grupos representados por las ramas que se abren.

#### **V.5.5 Heterocigocidad**

El valor del PIC (“Polymorphic Information Content”) es un parámetro frecuentemente utilizado para medir la capacidad discriminatoria de los loci. Los microsatélites presentan elevado polimorfismo que, los hace muy útiles para identificaciones genotípicas, porque es muy poco probable que dos genotipos elegidos al azar, si son analizados para una serie de estos marcadores, compartan todos sus alelos (Melbourne *et al.*, 1997; Provan *et al.*, 1996; Rongwen *et al.*, 1995).

Los iniciadores S084 y S011 son los que presentaron los valores mas altos de Contenido de Información Polimórfica con valor igual  $PIC = 0.85$ , pero se está considerando al locus S011 como un todo, pero éste presenta dos zonas muy

definidas que debemos tomarlo como dos locus por separado (S011a y S011b), y en este caso su PIC por separado es  $PIC = 0.82$

En los casos de indicadores multiloci se debe considerar como loci diferentes, ya que presentan bandas que se puede diferenciar muy nítidamente y también las zonas de separación están separados en la mayoría de los casos, salvo el locus S095 donde podemos distinguir dos zonas, donde el locus S095b está incluido dentro del S095a.

Se observa que no siempre el locus que tiene el mayor número de alelos es el que tiene el más alto PIC. Véase el locus S011 presenta 13 alelos con un  $PIC = 0.847$ , pero el locus S084 con 12 alelos tiene el  $PIC = 0.848$ , caso similar ocurre con el locus S056 que presenta 6 alelos con un  $PIC = 0.42$  y el locus S0106 que presenta solo 4 alelos con un  $PIC = 0.561$ . En ambos casos resultaron tener un PIC más alto con menor número de alelos. Para el Índice de diversidad el PIC más bajo resultó con el número de alelos más bajo también, el locus S020 con solo 3 alelos con un  $PIC = 0.361$ .

## **V.6 Interpretación del programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System)**

El dendograma que me muestra, evidencia que los datos obtenidos con los 18 pares de iniciadores fué suficiente para diferenciar los 40 cultivares nativos de papa. No hay evidencia de duplicados. Pero si un grupo muy cercano que tiene un grado de similitud de 0.964 se dió entre los cultivares nativos: 703844 (*S. stenotomum*) con 704481 (*S. goniocalix*). Vemos que son dos cultivares nativos que pertenecen a especies diferentes pero que son ambas diploides: 703844 “añil papa” con 704481 “amarilla”, pero estos a su vez son excelentes para el procesado con buena cantidad de materia seca, fritura y bajo contenido de azúcares reductores, este acercamiento se da

fundamentalmente a que ambas especies son diploides y que sus bandas (alelos), han coincidido en 96% con los 18 iniciadores analizados, esto se debería principalmente a que su flujo génico vendría de un acervo genético común, siendo *S. stenotomum* que habría dado origen a *S. goniocalix* según el esquema de las relaciones evolutivas de las especies cultivadas de papa y sus niveles de plodía (adaptada de Hawkes, 1992). También se da el caso que tanto diploides, triploide, tetraploides y pentaploides tienen un espectro común de variabilidad genética a pesar que su número cromosómico es diferente, siendo la única manera de determinar el nivel de ploidía es el conteo de cromosomas (Correll, 1962).

Las dos *S. chaucha* se involucran dentro del grupo de las *S. andigenas*, acá podemos decir que estos cultivares nativos son triploides pero con algunos iniciadores se han comportado como tetraploides incluso pentaploides, y por ello de alguna manera se ubican dentro del grupo *S. andigena*, lo que se sugiere en esta caso analizar por otro método de contar cromosomas para ver realmente, si son triploides.

Al inicio de nuestras evaluaciones pusimos papas amargas *S. juzepczukii* y *S. curtilobum*; un cultivar por especie; como un comparativo, ya que estas en su mayoría presentan altos contenidos de azúcares reductores y por ende su fritura es de pésima calidad. Vemos en el dendrograma que se agrupan compartiendo cierto grado de similaridad.

Si hacemos un corte transversal en el dendrograma a la altura de grado de similaridad igual a 0,80, vemos que hay 10 cultivares nativos con excelentes cualidades para procesamiento, lo que supondría que las bandas (alelos) comunes a estos cultivares podrían contener información muy valioso en la búsqueda de genes candidatos en la producción de azúcares reductores.

## VI CONCLUSIONES

1. - Se identificaron variedades nativas excelentes para el procesamiento ya que presentan ventajas de sabor, color, textura, mayor contenido materia seca ( 24-32%) que significa mayor producto después del procesado, menos absorción de aceite, menor tiempo de fritura con un ahorro de energía y aceite.
2. - El estudio de los factores de calidad en materia seca y azúcares reductores, nos da pautas para el uso de estas variedades en la agroindustria, ya que estos cultivares nativos contienen alta concentración de materia seca muy superior con cualquier papa mejorada, así como también muy baja concentración de azúcares reductores incluso después de su almacenamiento en frío y a temperatura ambiente siendo estas dos características fundamentales en la industrialización sobre todo en hojuelas. La gran variabilidad en el contenido de azúcares reductores presentes en estas variedades, permite identificar materiales con niveles muy bajos y estables en contenidos de glucosa y fructosa, que aunado al color de la pulpa, producirá bocaditos de excelente calidad en color y sabor.
3. - Estos cultivares nativos de papa resistentes al endulzamiento en frío brindan beneficios económicos y de salud, como son la calidad del producto, no uso de inhibidores de brotamiento, menores pérdida de peso, menos problemas con los cambios fisiológicos del tubérculo.
- 4.- Los microsátélites demostraron ser una herramienta confiable para determinar la diversidad genética de estos 40 cultivares nativos de papa y elaborar patrones alélicos que permite diferenciar una variedad de otra.

## VII RECOMENDACIONES

1. - Conocer los aspectos bioquímicas de las papas nativas almacenadas permitirá dar soluciones a problemas de procesamiento. Los investigadores deben de usar el almacenamiento en frío como una herramienta fundamental de acuerdo con la finalidad de ser usada después. Es importante saber el comportamiento de cada variedad, ya que algunas presentan tolerancia al frío más que otras y ver su futuro proceso para luego ser utilizadas cuando la demanda sea escasa.
2. - Seguir investigando el contenido de azúcares reductores sobre todo en el tratamiento al frío (4 °C), y buscar genes involucrados en la producción de azúcares reductores, sería un trabajo mucho mas completo.
3. - Hacer conocer estos cultivares nativos de papa.
4. - Se han identificado cultivares nativos de papa con altos contenidos de materia seca y estabilidad en su contenido de azúcares reductores en condiciones de frío de la zona andina. Sin embargo, éstas no pueden ser aprovechadas directamente debido a sus bajos rendimientos, forma apropiada del tubérculo, periodos vegetativos largos y dormancias cortas o muy largas. Se recomienda ser utilizadas en futuros programas de mejoramiento.
5. - Se recomienda hacer el conteo de cromosomas en algunas variedades de papa, sobre todo en las variedades que excedieron en ploidía.
6. - Tener un programa de multiplicación y de mejoramiento de estos cultivares nativos.

## VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAGI, H., YOKOZEKI, Y., INAGAKI, A., FUGIMURA, T. 1996. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 93:1071-1077.
- AKKAYA, M.S., SHOEMAKER, R.C., SPECHT, J.E., BHAGWAT, A.A., CREGAN, P.B. 1995. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Sci* 35: 1439-1445.
- ALVAREZ, M. y REPO, R. 1999. Desarrollo de productos a base de papas nativas. Co-published by CIP and the Consortium for Sustainable Development in the Andean Ecoregion (CONDESAN). 178pp.
- AMOROS, W., ESPINOZA, J., BONIERBALE, M. 2001. Assessment of variability for processing potential in advanced potato populations. Lima (Perú). CIP. ISSN 1680-9270. AP(AR.2018), pp 185-195.
- ARESHCHENKOVA, T., GANAL, M. 1999. Long tomato microsatellites are predominantly associated with centromeric regions. *Genome*, 42: 536-544.
- ASHIKAWA, I., KURATA, N., SAJI, S., UMEHARA, Y., SASAKI, T. 1999. Application of restriction fragment fingerprinting with a rice microsatellite sequence to assembling rice YAC clones *Genome/Génome* 42(2): 330-337.
- BADUI, S. 1999. Química de los alimentos. 3ed. 5ta. Reimpresión Editorial Alambra Mexicana. México. 648pp.
- BECERRA, V., GEPTS, P. 1994. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in its centres of origin. *Genome* 37: 253-263
- BELL, C. J., ECKER, J.R. 1994 Assignment of 30 microsatellite Lohnes, Inheritance of resistance loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 19: 137-144.
- BONIERBALE, M. 2002. Exploration of new incentives for on-farm conservation of diversity, Boletín de la papa Vol. 4 Nro. 3, Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú.
- BONIERBALE, M., AMOROS W., ESPINOZA J., LI X.Q., WALKER, T. 2000. Estrategias y Desafíos para el Mejoramiento de Papa para Procesamiento. Centro

- Internacional de la Papa, Lima Perú; Agriculture & Agri-Food, New Brunswick, Canada.
- BONIERBALE, M., SIMON, R., ZHANG, D. P., GHISLAIN, M., MBA, C., LI, X.-Q. 2003. Genomics and molecular breeding for a root and tuber crop improvement. In: Plant molecular breeding, pp 216-253.
- BOUCHON, P., AGUILERA, J.M., PYLE, D. L. 2003. Structure Oil–Absorption Relationships During Deep-Fat Frying. *Journal of food science*. Vol. 68, Nr. 9. 2711-2716.
- BRONDANI, R., BRONDANI, C., TARCHINI, R., GRATTAPAGLIA, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor. Appl. Genet.* 97:816-827.
- BROUN, P., TANKSLEY, S.D. 1996. Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome. *Mol. Gen. Genet.* 250:39–49.
- BUKASOV, S.M. 1981. Sistemática de las especies de papa sección *Tuberosum* (Dun) Buk. género *Solanum* L. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. Proyecto IICA-CIID.
- BURTON, W.G. 1966. The potato, a survey of its history and of factors influencing its yield, nutritive value, quality and storage. (Netherlands). H. Veenman & Zonen N.V. 2. ed. 382 p.
- BURTON, W.G. 1972. Physiological and biochemical changes in the tuber as affected by storage conditions. Triennial Conference EAPR. Norwich, England (UK). 4-9 Sep 1972.
- BURTON, W.G. 1978. Post-harvest behaviour and storage of potatoes. New York (U.S.A.). Academic Press. 1978. pp 86-228.
- BURTON, W.G., van ES, A., HARTMANS, K.J. 1992. The physics and physiology of storage. In *The Potato Crop: The scientific basis for improvement*. Ed. P.M. Harris. Chapman & Hall, London, pp 608-709.
- CAETANO, G. 1994. Staining Nucleic acid with Silver: An alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promeg Notes Magazine*. N° 45.USA.

- CARDLE, L., RAMSAY, L., MILBOURNE, D., MACAULAY, M., MARSHALL, D., WAUGH, R. 2000. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics*, 156: 847–854.
- CHAMBERS, G.K., MACAVOY, E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 126: 455-476.
- CHANG-AI, X.U. 2004. Enzymatic Analysis of Sugar-Starch conversion in Potato. Thesis. Facultad of Forestry and Environmental Management. University of New Brunswick Fredericton, NB
- CHEN, X., SALAMINI, F., GEBHARDT, C. 2001. A potato molecular-function map for carbohydrate metabolism and transport. *Theoretical and Applied Genetics (Germany)*. 102: 284-295.
- CHO, Y.G., ISHII, T., TEMNYKH, S., CHEN, X., LIPOVICH, L., MCCOUCH, S.R., PARK, W.D., AYRES, N., CARTINHO, S. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100: 713-722.
- CIAT, 2002. Investigación y transferencia de tecnología sobre calidad de almidones, azúcares y valoración energética de materiales de papa. Programa Nacional de Maquinaria Agrícola y Postcosecha. Bogota 12p
- COFFIN, R.L., YADA, R.H., PARKIN, K.L., GRODZINSKI, B., STANLEY, D.W. 1987. Effects of low temperature storage on sugar concentrations and chip color for certain processing potato cultivars and selection. *Journal of Food Science* v. 52, No.3:639-645.
- COLON, L.T., SIIJPKES, L., HARTMANS, K.J. 1989. The cold stability of *Solanum goniocalyx* and *S. phureja* can be transferred to adapted diploid and tetraploid *S. tuberosum* germplasm. In: Louwes, K.M.; Toussaint, H.A.J.M.; Dellaert, L.M.W. (comp.). Parental line breeding and selection in potato breeding. Proceedings of a joint conference. Conference of the EAPR Breeding Section and the EUCARPIA Potato Section, Wageningen (Netherlands). 11-16 Dec 1988, pp 76-80.



- CREGAN, P.B., JARVIK, T., BUSH, A.L., SHOEMAKER, R.C., LARK, K.G., KAHLER, A.L., KAYA, N., VANTOAI, T.T., LOHNES, D.G., JCHUNG, J., SPECHT, J.E. 1999. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci.* 39:1464–1490.
- CRICI, J., LÓPEZ, M. 1993. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Monografía N° 26, serie de Biología, Organización de los Estados Americanos. Washington D.C EE.UU. 132pp.
- DALE, M.F.B., MACKAY, G.R. 1994. Inheritance of table and processing quality. In *Potato Genetics*. Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI). pp 285-315.
- DICE, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26:297- 302.
- DILLS, W.L.JR. 1993. Protein fructosylation: fructose and the Maillard reaction. . *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, Md.: Amaerican Society for Clinical Nutrition. Vol 58, 779S-787S.
- DIWAN, N., CREGAN PB (1997). Automated sizing of fluorescent-labeled simple equence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor Appl Genet* 95:723-733.
- DON, R.H., COX, P.T., WAINWRIGHT, B.J., BAKER, K., MATTICK J.S., 1991. Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19: 4008.
- DOUCHES, D.S. 1994. Breeding and Genetics For the Improvement of Potato (*Solanum tuberosum* L.) For Yield, Quality, and Pest Resistance. Department of Crop and Soil Sciences. Michigan States University.USA
- DOUCHES, D.S.; FREYRE, R. 1994. Identification of genetic factors influencing chip color in diploid potato (*Solanum* spp.) *American Potato Journal* 71(9): 581-590.
- DUDLEY, J.W. 1994. Comparison of Genetic Distance Estimators using Molecular Marker Data. *Analysis of Molecular Marker Data*. Corvallis, Oregon. *Proceedings*. Corvallis, American Society for Horticultural Science and Crop Science Society of America, pp 3-7.

- DUFFUS, C.M., DUFFUS, J.H. 1984. Carbohydrate metabolism in plants. New York, Longmans, pp 53-54.
- ECHT, C.S., MAY-MARQUARDT, P., HSEIH, M., ZAHORCHAK, R. 1996. Characterization of microsatellite markers in Eastern white pine. *Genome*, 39: 102–1108.
- ENGEL, F. 1970. Exploitation of the Chilca Canyon Peru . Research Report, current Anthropology, 11:55-58.
- ESTRADA, N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Programa de Investigación de la Papa (PROINPA); Centro de Información para el Desarrollo (CID); Centro Internacional de la Papa (CIP). La Paz (Bolivia). 372 pp.
- EWING, E. 1977. Potato en *The physiology of vegetable crops*. Oxon (UK). CAB International. ISBN 0-85199-146-7. 1997. Cambridge, pp 295-344.
- FARKAS, B.E., SINGH, R.P., MCCARTHY, M. J. 1992. Measurement of oil/water interface in foods during frying. In: Singh RP, Wirakartakusumah A, editors. *Advances in food engineering*. Boca Raton, Fla.: CRC Press., pp 237–245.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Centro Nacional de Investigación de Recursos Genéticos y Biotecnología (CENARGEN). 221 pp.
- FIELD, D., WILLS, C. 1998. Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 1647-1652.
- GARNER, T.W.J. 2002. Genome size and microsatellites: the effect of nuclear size on amplification potential. *NBC Canada Genome* 45: 212–215.
- GEIGENBERGER, P. 2003. Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *Journal of Experimental Botany*, Vol 54 No 382: 457-465 pp. gene pools of a wild bean core collection. *Crop Science* 36:1375-1384.

- GHISLAIN, M., RODRIGUEZ, F., VILLAMON, F., NUNEZ, J., WAUGH, R., BONIERBALE, M. 2000. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. CIP Program Report 1999-2000, pp 167-174.
- GHISLAIN, M., RODRIGUEZ, F., VILLAMON, F., NUNEZ, J., WAUGH, R., BONIERBALE, M. 2001. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. International Potato Center (CIP), Lima (Peru). Scientist and farmer: Partners in research for the 21st century. Program Report, 1999-2000.
- GOLDSTEIN, D.B., POLLOCK D.D. 1997. Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference. *Journal of Heredity*, vol. 88, no. 335-342.
- GOLDSTEIN, D.B., SCHLOTTERER, C. 1999. *Microsatellites: Evolution and applications*, Oxford: Oxford University Press. 368pp.
- GORG, R., SCHACHTSCHABEL, U., RITTER, E., SALAMINI, F., GEBHARDT, C. (1992). Discrimination among 136 Tetraploid potato varieties by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. *Crop Science* 32: 815-819.
- GOULD, W.A. 1989. Quality of potatoes for chip manufacture. Symposium Potato Quality Industry Needs for Growth. Colorado (USA). Imprint Orono (USA). The Potato Association of America, pp 10-20.
- GRAIN, 2002. Genetic Resources Action International (GRAIN) Seedling, Vol. 17 - No. 4. [www.grain.org/publications/dec003-en-p.htm](http://www.grain.org/publications/dec003-en-p.htm)
- GRAY, D., HUGHES, J.C. 1982. Tuber quality. In: *The Potato crop: the scientific basis for improvement* (Ed. P.M. Harris) Chapman & Hall, London, pp 504-539.
- GRUN, P. 1990. The evolution of cultivated potatoes. *Economic Botany* 1990. (Suppl.) (USA). 44(3):39-55.
- GUPTA, P.K., VARSHNEY, R.K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with special emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- GUPTA, P.K., BALYAN, H.S., SHARMA, P.C., RAMESH, B. 1996. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current Science* 70: 45-54.

- HANCOCK, J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In *Microsatellites: evolution and applications*. Edited by D.B. Goldstein and C. Schlötterer. Oxford University Press, Oxford, pp 1–9.
- HAWKES, J. C. 1941. Potato collecting expeditions in Mexico and South America. Bull. Imp. Bur. Plant Bred. Genet. Cambridge. 30pp.
- HAWKES, J. C. 1967. The history of the potato, part I - III - Masters memorial lecture, 1966. *The Journal of the Royal Horticultural Society (UK)*, pp 207-224.
- HAWKES, J.G. 1990. *The potato evolution, biodiversity and genetic resources*. London (UK). Belhaven Press. 259 pp.
- HERRERA, F. L. 1921. *Contribución de la flora del departamento del Cusco*. Primera parte, segunda ed. Publicada por la Universidad del Cusco, Imprenta del trabajo. Cusco. 241pp.
- HESEN, J.C. 1976. Aims, achievements and future plans regarding research projects in the interest of the European potato chip industry. Wageningen (Netherlands). Instituut voor Bewaring en Verwerking van Landbouwprodukten (IBVL). Publikatie no. 293. 39 pp.
- HESEN, J.C. 1991. Quality of potatoes for the processing industry. en *Production, post-harvest technology and utilization of potato in the warm tropics*. Mauritius Sugar Industry Research Institute. 1991, pp 149-154.
- HOLDEN, J.H.W. 1981. Problems in breeding for tuber quality. Meeting of the Breeding Section and Varietal Assessment of the European Association for the Potato Research. Edinburgh (UK). *Potato Research (Netherlands)*. 24(2):206-207.
- HOOVER, E.F., XANDER, P.A. 1961. Potato composition and chipping quality. *American Potato Journal (USA)*. 1961. 38(5), pp 163-170.
- HUAMÁN, Z. 1986. *Botánica sistemática y morfología de la papa*. Lima (Perú) Boletín de Información Técnica - Centro Internacional de la Papa (CIP). no. 6. 2da. ed. 22 pp.
- HUAMÁN, Z. 2000. Semilleros Comunales de Papas Nativas del Perú. *Revista AgroNoticias*, No. 251 (Noviembre 2000, Lima, Perú): pp 28-31.

- HUAMÁN, Z., ROSS, R.W. 1985. Updated Listing of Potato Species Names, Abbreviations and Taxonomic Status. International Potato Center. Lima Perú. pp 629-642.
- ISHERWOOD, F.A. 1976. Mechanism of starch-sugar interconversion in *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*. pp 33-41.
- ISHII, T., MORI, N., OIGHARA, Y. 2001. Evaluation of allelic diversity at chloroplast microsatellite loci among common wheat and its ancestral species. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 896-904.
- JARNE, P., LAGODA, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11(10): 424-429
- KARP, A., KRESOVICH, S., BHAT, K.V., AYAD, W.G., HODGKIN, 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: A guide to the technologies. International Plant Genetic Resources Institute . IPGRI Technical Bulletin. No. 2.
- KLEINSCHMIDT, G.D., KLEINKOPF, G.E., WESTERMANN, D.T., ZALEWSKI. 1984. Specific gravity of potatoes. University of Idaho, College of Agriculture. Cooperative Extension Service Agricultural Experiment Station. Current Information series No. 609
- KUBIS, S., SCHMIDT, T., HESLOP-HARRISON, J.S. 1998. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Ann. Bot.* 82 (Suppl. A): 45-55
- LEFORT, F., BRACHET, S., FRASCARIA-LACOS, T.E.N., EDWARDS, K.J., DOUGLAS, G.C. 1999. Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the Oleaceae. *Molecular Ecology* 8(6): 1088-1090.
- LEVINSON, G., GUTMAN, G.A. 1987. Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4: 203-221.
- LISINSKA., LESZCZYNSKA. 1989. Potato science and technology. London (UK). Elsevier applied Science. 1989. 391 pp.
- LIU, Z.W., BIYASHEV, R.M., SAGHAI MAROOF, M.A. 1996. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 93: 869- 876.

- LOVE, S. L., PAVEK, J. J., THOMPSON-JOHNS, A., BOHL, W. 1998. Breeding progress for potato chip quality in North American cultivars. In American Journal of Potato Research (USA). 75(1): 27-36.
- LULAI, E.C., ORR, P.H, 1979. Influence of potato specific gravity on yield and oil content of chips. American Potato Journal (USA). 56(8): 379-390.
- MACAUBAS, C., LI JIN., HALLMAYER, J., KIMURA, A., MIGNOT, E., 1997. The Complex Mutation Pattern of a Microsatellite. Genome Research 7: 635-641.
- MARKERS for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica, 113: 163–185.
- MARWAHA, R.S.1998. Factors determining processing quality and optimum processing maturity of potato cultivars grown under short days. Journal of the Indian Potato Association. ISSN 0970-8235. 1998. 25(3-4): 95-102.
- MAUGHAN, P.J., SAGHAI-MAROOF, M.A., BUSS, G.R. 1995. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. Genome 38: 715-723.
- McCOUCH, S. R., CHEN, X., PANAUD, O. 1997. Microsatellite mapping and applications of SSLP's in rice genetics and breeding, Plant Mol. Biol., 35: 89-99.
- MILBOURNE, D., MEYER, R., BRADSHAW, J.E., BAIRD, E., BONAR, N.,PROVAN, J., POWELL, W., WAUGH, R. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. Mol. Breed. 3:127-136.
- MORENO, M, J.D. 2000 . Calidad de la papa para usos industriales. Bogota (Colombia) Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). 2000. 7pp.
- MORGANTE, M., OLIVIERI, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant J. 3:175-182.
- MORGANTE, M., OLIVIERI, A.M. 1994. Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. Genome 37:763-769.
- MORRELL, S., REES T. 1986. Sucrose metabolism in developing tubers of *Solanum tuberosum*. Phytochemistry 25, 1579-1585.
- MULLIS, K.B., FALOONA, F.A 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155: 335–350.

- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1989. Lost crops of the Incas: Little know plants of the Andes with promise for world wide cultivation. Potatoes National Academy Press. Washington O.C., USA, pp 92-103.
- OCHOA, C.M. 1975. Potato collecting expeditions in Chile, Bolivia & Peru and the genetic erosion of indigenous cultivars. Cambridge (UK). Cambridge University Press,, pp 167-174.
- OCHOA, C.M. 1999. Las papas de Sudamérica: Perú (parte 1). Kansas (USA). Allen Press. 1036 pp.
- ORDÓÑEZ, C.R. 1982. “Pardeamiento no enzimático” en Calidad de la papa (*Solanum tuberosum* L.) como materia prima para la industria. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía (Argentina). Buenos Aires (Argentina). Subsecretaria de Ciencia y Tecnología. 225 pp.
- OTAZÚ, V. 2001. Reconocimiento a los Conservadores de la Biodiversidad de la papa, en Perspectivas Tecnológicas en el uso de Germoplasma de Papas Nativas. Ministerio de Agricultura del Perú, Instituto Nacional de Investigación Agraria, INIA, Centro Internacional de la Papa, CIP. Agosto de 2001.
- PEJIC, I., AJMONE-MARSAN, P., MORGANTE, M., KOZUMPLICK, V., CASTIGLIONI, P., TARAMINO, G., MOTTO, M. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor Appl Genet* (1998) 97:1248-1255.
- PEREIRA, A. da S. YADA, R.Y. TAI, G.C.C. COFFIN, R.H. SOUZA MACHADO, V. 1992. Use of sugar content for indirect selection of chip color in potatoes. In *Sum. only. American Potato Journal* (USA). 69(9):603
- POWELL, W., MACHRAY, G.C., PROVAN, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1: 215-222.
- PROMEGA CORPORATION. 2000. Silver sequence™ DNA sequencing system. Technical manual. EE.UU.
- PROVAN, J., POWELL, W., WAUGH, R. 1996. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theoretical and Applied Genetics* (Germany). 92(8): 1078-1084.

- RASTOVSKI, A.; van Es, A. 1981. Storage of potatoes: Post-harvest behaviour, store design, storage practice, handling. Wageningen (Netherlands). PUDOC. 1981. 462 pp.
- RAUPP, J. 2002, Enzymatic browning of potatoes is greatly reduced with organic fertilization compared to mineral fertilization. Paper presented at 14th IFOAM Organic World Congress, Victoria BC, Canada, 21-24; Published in Proceedings 14th IFOAM Organic World Congress, 67p.
- REES, T., DIXON, W.L., POLLOCK, C. J., FRANKS, F. 1981. Low temperature sweetening of higher plants. In: Friend, J. and Rhodes, M.J.C. (eds.). Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables. New York: Academic Press, pp 41-61.
- RÖDER, M.S., KORZUN, V., WENDEHAKE, K., PLASCHKE, J., TIXIER, M.H LEROY, P., GANAL, M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. Genetics 149:2007–2023
- ROHLF, F.J. 1992. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 1.7. Owner's manual. Exeter Publishers Ltd., Setauket, N.Y.
- ROHLF, F.J. 1993. NTSYS-pc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software. Setauket .New York.EE.UU.
- RONGWEN, J., AKKAYA, M.S., LAVI, U., CREGAN, P.B. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. Theor Appl Genet. 19: 43-48.
- ROSS, A. F., 1959. Dinitrophenol method for reducing sugars. The Avi. Publishing Comp. Westport.
- ROSS, H.A., DAVIES, H.V. 1992. Sucrose metabolism in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.): Effect of sink removal and sucrose flux on sucrose-degrading enzymes. Plant Physiol 98:287-293.
- SAAL, B., WRICKE, G. 1999. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.). Genome 42:964-972.



- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. 1988. Primed-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-494
- SAIKI, R.K., SCHARF, S.J., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354
- SCHLÖTTERER, C., TAUTZ, D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 20:211-215.
- SELF, R., CASEY, J.C., SWAIN, T. 1964. Studies on the flavour of cooked potatoes. Triennial Conference EAPR. Pisa (Italy). 2-7 Sep 1963. European Association for Potato Research. EAPR proceedings. 78pp
- SENIOR, M. M., HEUM, M. 1995. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a ct primer. *Genome* 36: 884-889.
- SINHA, N.K., CASH, J.N., CHASE, R.W. 1992. Differences in sugars, chip color, specific gravity and yield of selected potato cultivars grown in Michigan. *American Potato Journal (USA)*, 69(6):385-389.
- SMALL, D., PAHL, K. 2003. Storage structures and Ventilation. in *Guide to Commercial Potato Production on the Canadian Prairies* published by the Western Potato Council, 2003.
- SOWOKINOS, J.R. 2001. Biochemical and molecular control of cold-induced sweetening in potatoes. *American Journal of Potato Research (USA)*. 78(3): 221-236.
- SPOONER, D.M., McLean, K., RANSAY, G., WAUGH, R., BRYAN, G.J. 2005 A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings National Academy of Sciences (PNAS) (USA)*. ISSN 0027-8424. 2005. 102(41): 14694-14699.
- STOREY, R.M.J. DAVIS, H.V. 1992. Tuber quality. In. *The Potato Crop: the scientific basis for improvement* (Ed and Harris) Chapman & Hall, London, pp 507-569.

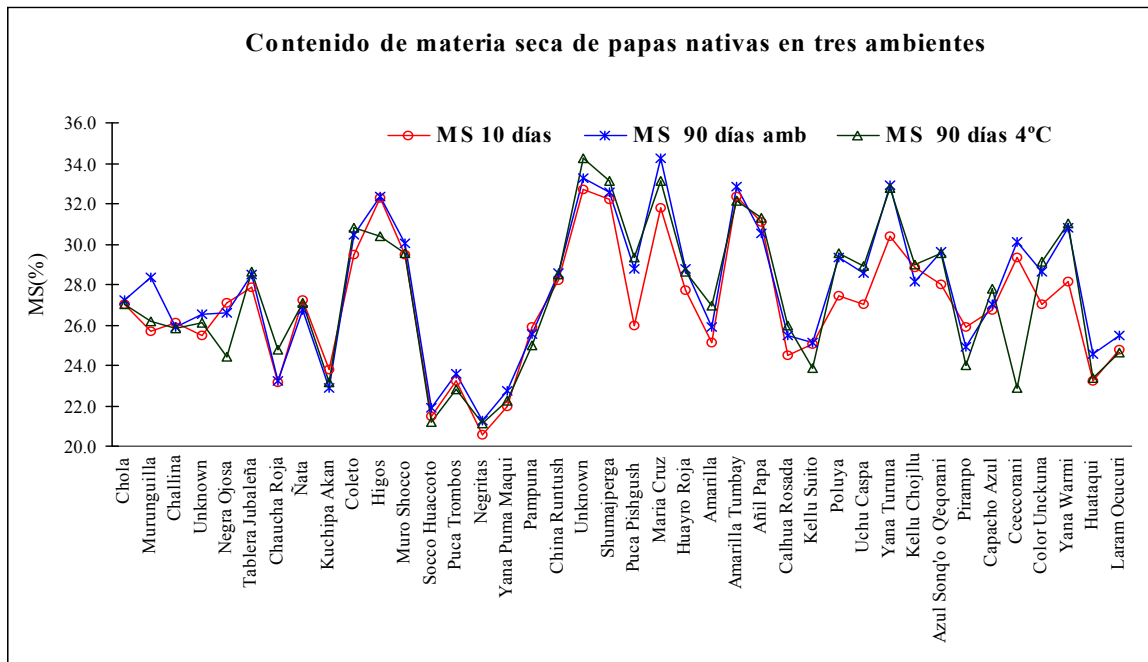
- STRAND, M., PROLLA, R.M., LISKAY, R.M., PETES, T.D., 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365: 274-276.
- TALBURT, W., SMITH, O. 1975. Potato processing. Ed. The AVI Publishing Company Inc. Connecticut, EEUU.
- TAUTZ, D., TRICK, M., DOVER, G. 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322: 652-653.
- TAUTZ, D. 1993. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: *DNA Fingerprint: State of the Science*. (Pena, S.D.J., Chakraborty, R., Epplen, J.T. and Jeffreys, A.J., eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, pp 21-28.
- THOMAS, M.R., SCOTT, N.S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence- tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* 86: 985-990.
- TOHME, J., GONZÁLEZ, O., BEEBE, S., DUQUE, M. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Science* 36:1375-1384
- TÚPAC YUPANQUI, A. 2001. Postcosecha y Comercialización de Tubérculos Andinos con Énfasis en papas Nativas y Ulluco. Ministerio de Agricultura del Perú, Instituto Nacional de Investigación Agraria, INIA, Centro Internacional de la Papa, CIP. Agosto de 2001.
- USDA (United States Department of Agriculture). 1916. Inventory of seeds and plants imported by the Bureau of plant Industry, Office of Forests Seed and Plant Introducing during the period from October 1 to December 31, 1913, Washington, D. C. EEUU (USA).
- VAN DE WIEL, C., ARENS, P., VOSMAN, B. 1999. Microsatellite retrieval in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Genome*, 42: 139–149.
- VAN ECK, H., ROUPPE VAN DER VOORT, J., DRAAISTRA, J., VAN ZANDVOORT, P., VAN ENCKEVORT, E., SEGERS, B., PELEMAN, J., JACOBSEN, E., HELDER, J., BAKKER, J. 1995. The inheritance and chromosomal allocation of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol Breeding* 1: 397-410.

- VAN ES, A; HARTMANS, K.J. 1987. Starch and sugar during tuberization, storage and sprouting. In: Storage of Potatoes: Postharvest Behavior, Store Design, Storage Practice, Handling. A Rastovski, A van Es (eds.), Pudoc, Wageningen, The Netherlands, pp 79-113.
- VAN HINTUM, T.J.L. 1995. Hierarchical approaches to the analysis of genetic diversity in crop plants. In: Core Collections of Plant Genetic Resources. Eds. Hodgkin, T.; Brown, A.H.D.; Van Hintum, T. J. L.; Morales, E.A.V. .International Plant Genet Resources Institute(IPGRI). A J. Wiley- Sayce Publication, pp 23-34.
- VÁSQUEZ, A. V. 1988. Mejoramiento genético de la papa. Primera edición. Ed. Amaru Editores. Lima (Perú). 1988. 208 pp.
- VAVILOV, V, N. 1951.The origen, varation immunity and breeding of cultivated plants, wathamm, masr, Crónica Botánica, 364pp.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M. 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407-4414
- WANG, Z., WEBER,J.L., ZHONG,G., TANKSLEY,S,D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. Theorical and Applied Genetics 88(1):1-6.
- WEISING, K., ATKINSON, R., GARDNER R.C, 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation .PCR Methods and Applications, Vol 4, 249-255
- WOOLFE, J.A. 1987. The potato in the human diet. Cambridge University Press. In collaboration with the International Potato Center, Lima (Peru). Cambridge. UK.231pp.
- WORKING, 1997. Group on Biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular. International Union for the protection of new Varietes of plants. (UPOV), Similarity, Clustering and Dendograms. Cambridge, UK.
- WU, K.S., TANSKLEY, S.D. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Mol. Gen. Genet. 241: 225-235.

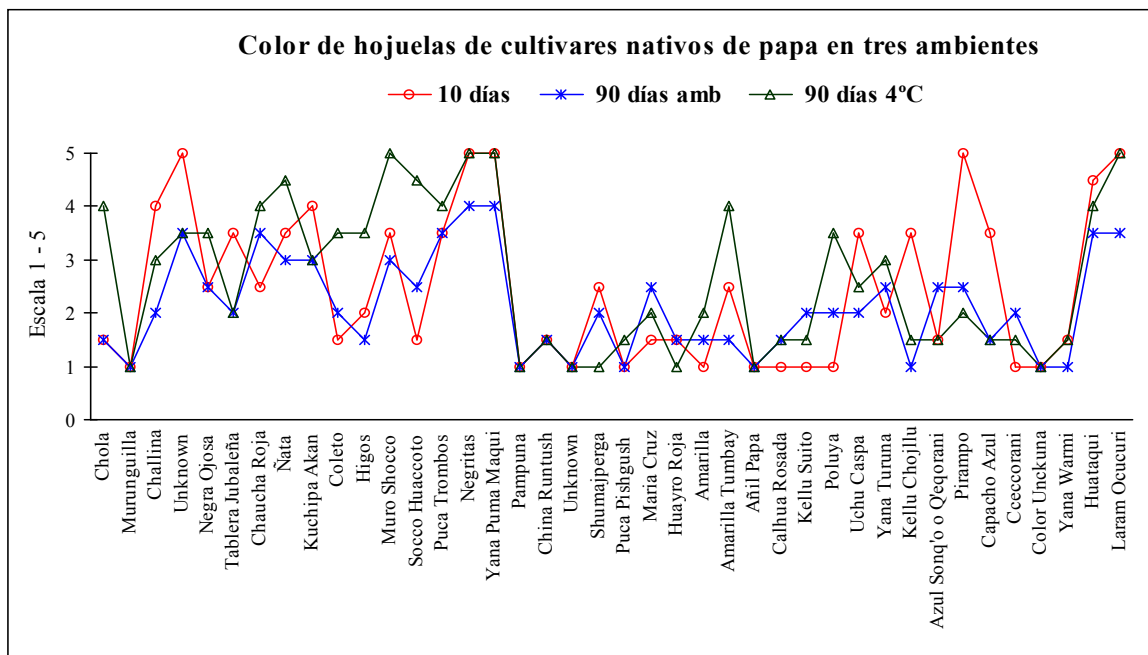
- YAPTENCO, K.F., SATO, H., SUZUKI, T., TAKANO, K., KOZIMA, T.T. 1999 Low temperature sweetening (LTS) and membrane degradation in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). Tokyo Nogyo Daigaku (Japan). Journal of Agricultural Science 44(2): 96-113
- YU, K., PARK, J., POYSA, .V., GEPTS, P. 2000. Integration of Simple Sequence Repeats (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris*). J Hered 91:429-434.
- ZANE, L., BARGELLONI, L., PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 11: 1-16.

## GRÁFICOS

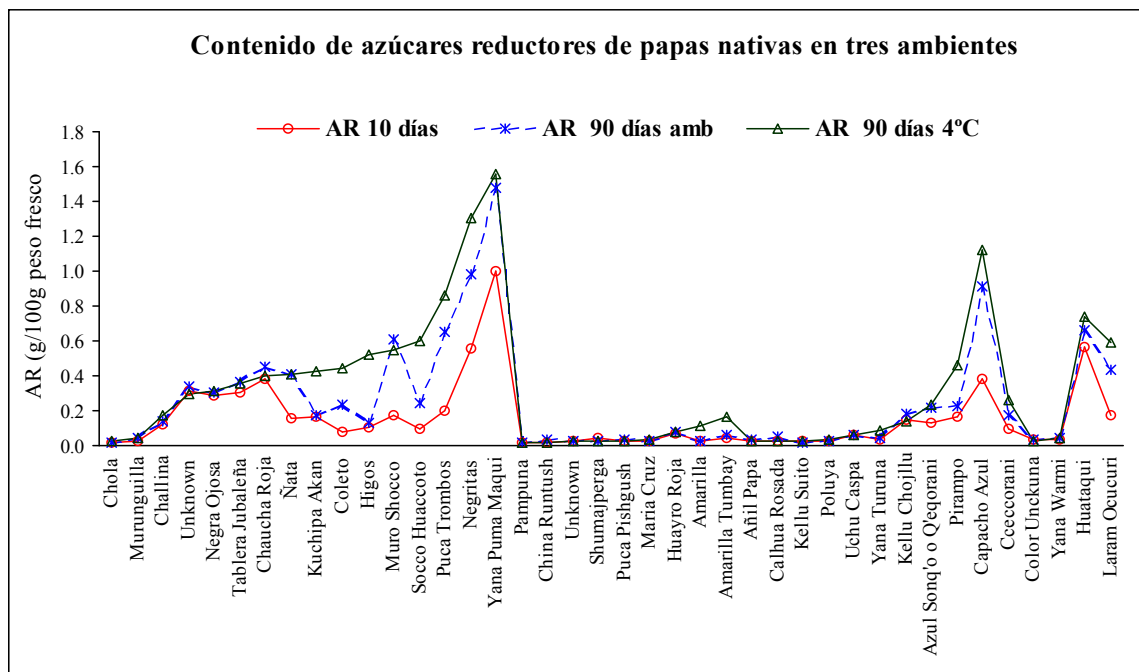
**Gráfico 1** Materia seca de 40 cultivares nativos de papa en tres tratamientos: 10 días después de la cosecha, 90 días temperatura ambiente almacén (T.A.) días temperatura ambiente almacén y 90 días cámara fría almacén ( C.F. 4° C)



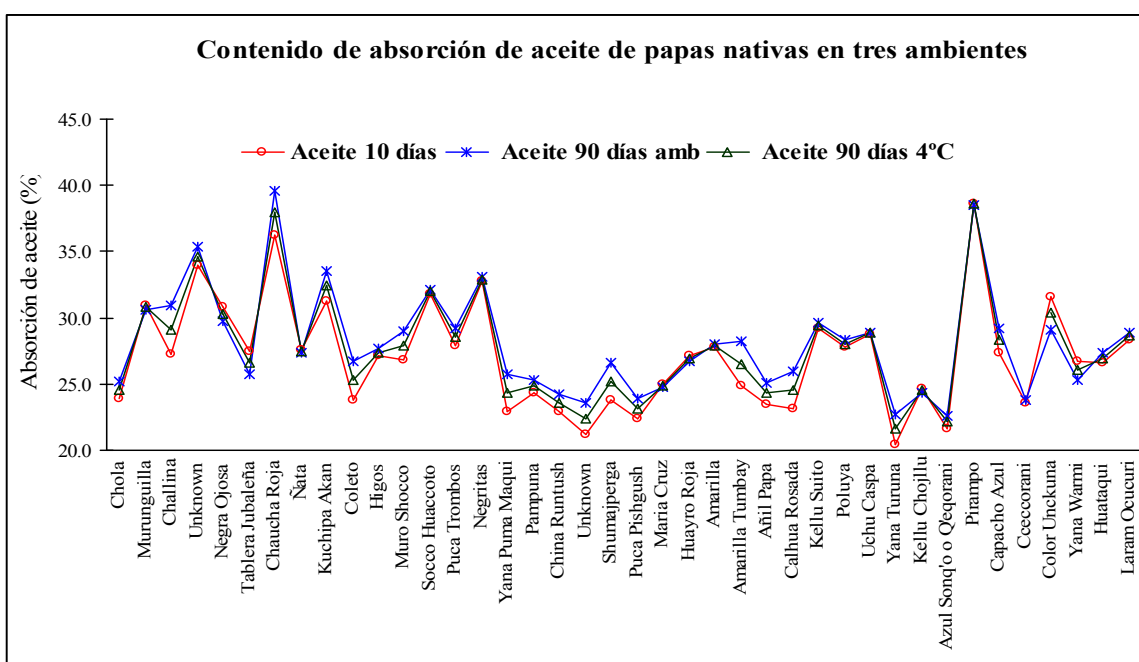
**Gráfico 2** Color de hojuelas de 40 cultivares nativos de papa en tres tratamientos: 10 días después de la cosecha, 90 días temperatura ambiente almacén (T.A.) días temperatura ambiente almacén y 90 días cámara fría almacén ( C.F. 4° C)



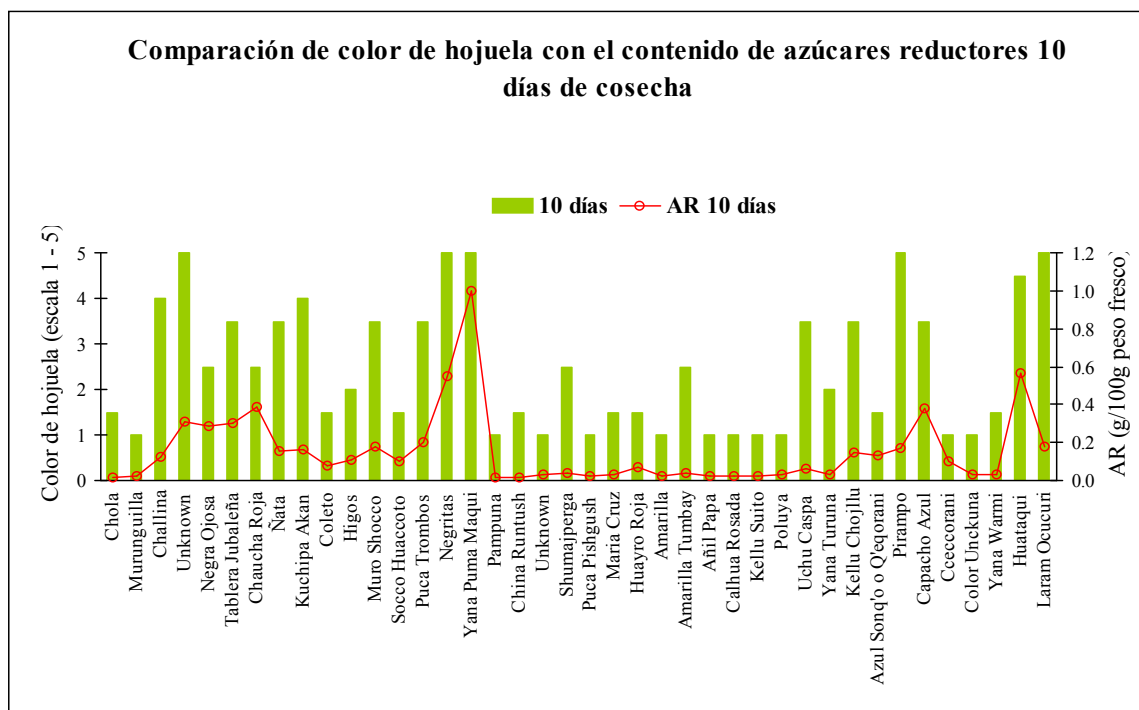
**Gráfico 3** Contenido de azúcares reductores de 40 cultivares nativos de papa en tres tratamientos: 10 días después de la cosecha, 90 días temperatura ambiente almacén ( T.A.) días temperatura ambiente almacén y 90 días cámara fría almacén ( C.F. 4°C) .



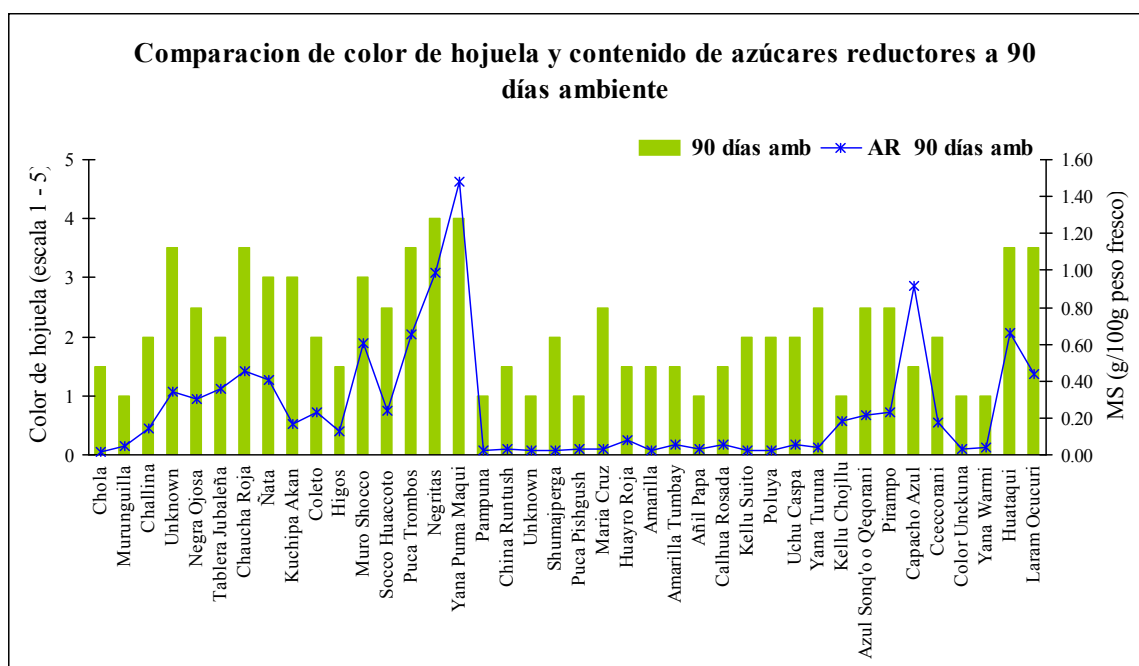
**Gráfico 4** Contenido de absorción de aceite de 40 cultivares nativos de papa en tres tratamientos: 10 días después de la cosecha, 90 días temperatura ambiente almacén (T.A.) días temperatura ambiente almacén y 90 días cámara fría almacén (C.F. 4°C) .



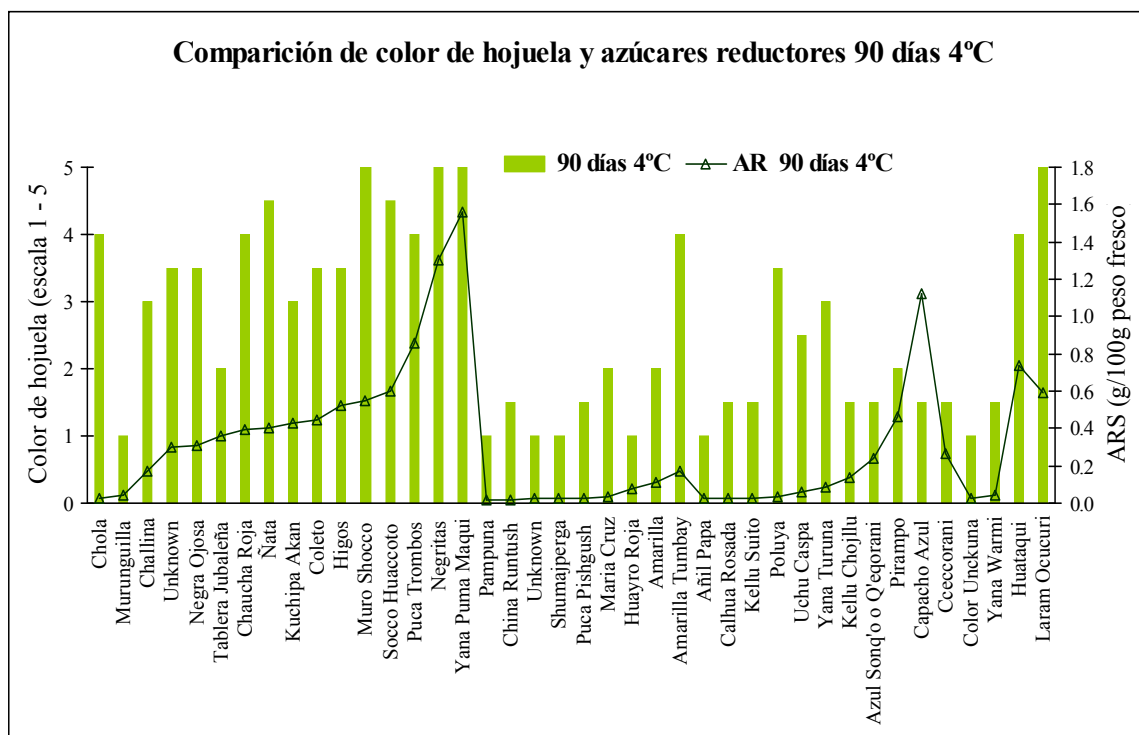
**Gráfico 5** Comparación de color de hojuela y contenido de azúcares reductores 10 días después de la cosecha de 40 cultivares nativos de papa.



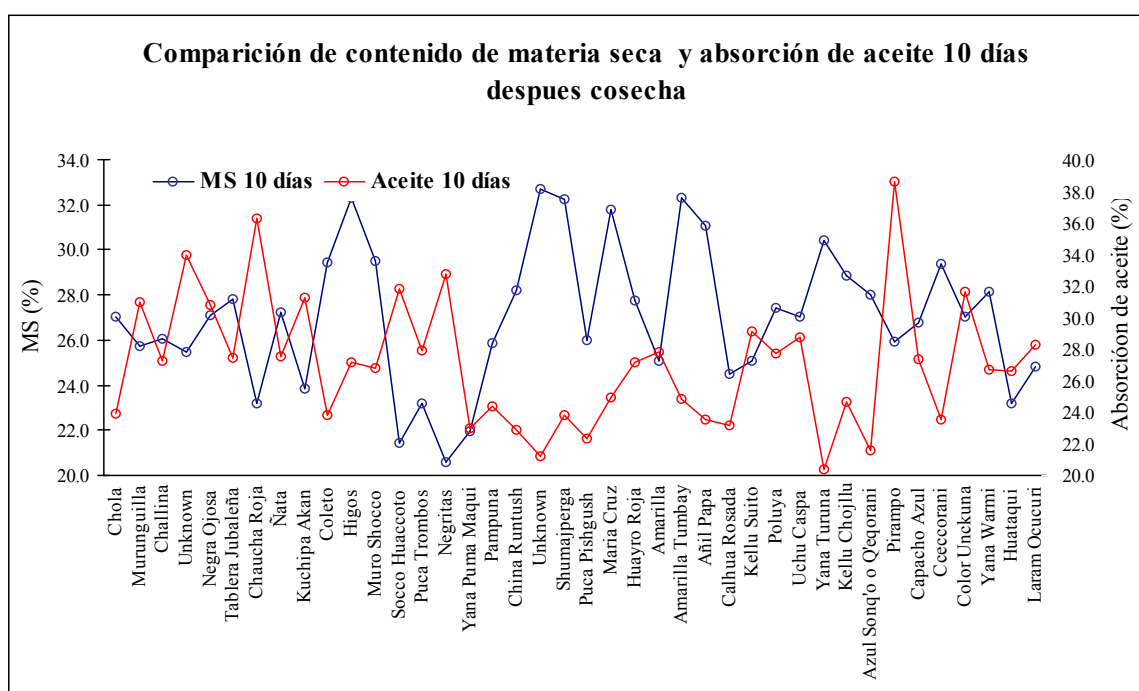
**Gráfico 6** Comparación de color de fritura y contenido de azúcares reductores 90 días después de la cosecha temperatura ambiente almacén (T.A.) de 40 cultivares nativos de papa.



**Gráfico 7** Comparación de fritura y contenido de azúcares reductores 90 días cámara fría almacén ( C.F. 4°C) de 40 cultivares nativos de papa.

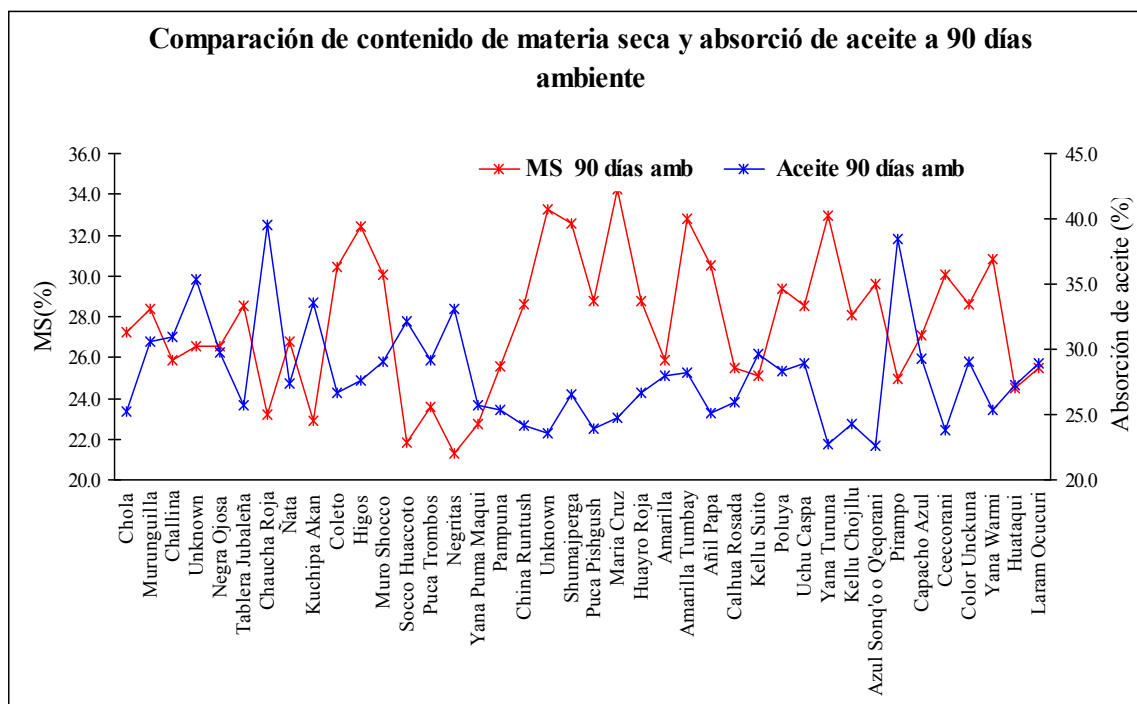


**Gráfico 8** Comparación del contenido de materia seca y absorción de aceite a 10 días después de la cosecha de 40 cultivares nativos de papa.

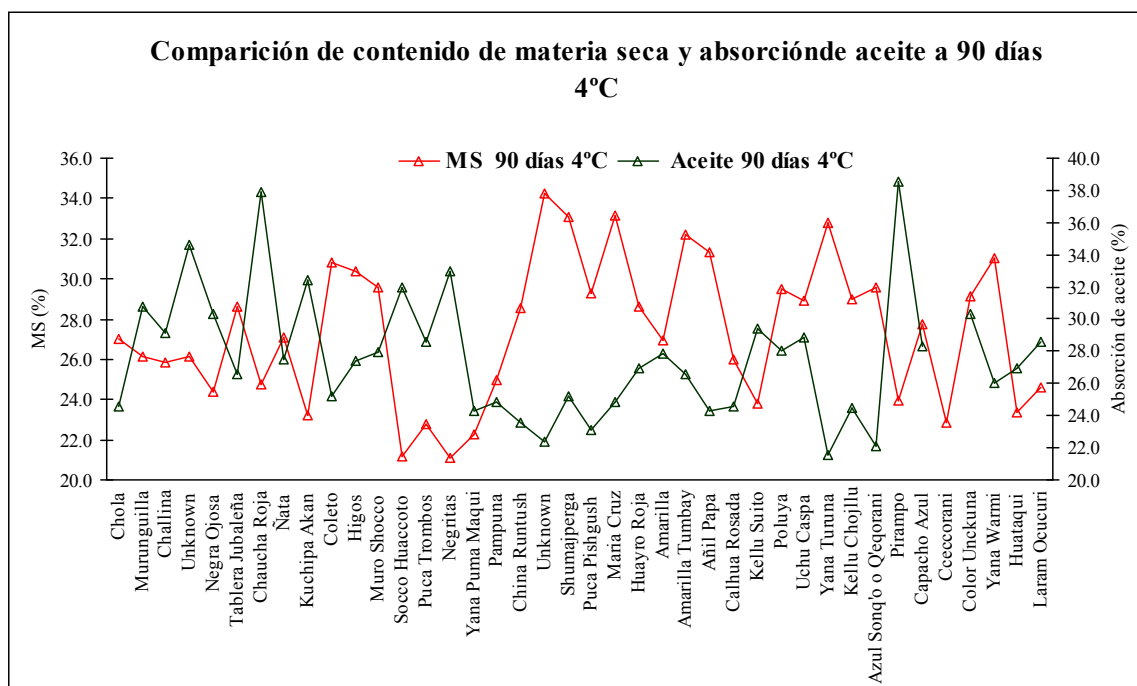




**Gráfico 9** Comparación del contenido de materia seca y contenido de absorción de aceite a 90 días temperatura ambiente almacén (T.A.) de 40 cultivares nativos de papa.



**Gráfico 10** Comparación de materia seca y la absorción de aceite a 90 días cámara fría almacén ( C.F. 4°C) de 40 cultivares nativos de papa.



## **ANEXOS**

### **ANEXO 1 Protocolo de extracción de ADN por el Método del CTAB (CIP 1997)**

1. En un mortero frió adicionar nitrógeno líquido lo suficiente para moler una cantidad de hojas frescas hasta que quede polvo liofilizado como para tres repeticiones,.
2. Transferir a un tubo Eppendorf y adicionar 700ul de 2X CTAB y 2ul de B-mercaptoethanol, llevar al vórtex y guardar en baño María 45 minutos a 65°C (cada 15 minutos sacarlo al ambiente y agitarlos muy suavemente, la gradilla donde están los eppendorf se agarra con la mano y hacer movimientos giratorios suavemente de la muñeca de la mano).
3. Añadir 700ul de alcohol cloroformo isoamílico (24:1) a cada tubo, mover los tubos invirtiéndolos varias veces. Muy suavemente para evitar ruptura del ADN
4. Llevar a centrifugar 14000rpm por 5 minutos. Transferir a otro tubo la fase de encima (sobrenadante), con mucho cuidado para no llevar la interfase.
5. Adicionar 50ul de CTAB al 10% (0.7M, NaCl), agitar en el vórtex.
6. Repetir los pasos 3 y 4.
7. Adicionar isopropanol (400-500ul) este debe estar a 4°C , invertir los tubos para mover y llevarlos 4°C por 30 minutos o -20°C por 15 minutos.
8. Centrifugar a 14000rpm por 20 minutos, luego cuidadosamente eliminar el sobrenadante para no perder el ADN precipitado. Dejar que el precipitado se seque invirtiendo los tubos abiertos durante unos 2 minutos.

9. Lavar el precipitado de ADN en 1ml de Etanol a 70% agitar por 3 minutos y centrifugar a 14000rpm durante 30 minutos. Eliminar con cuidado el etanol y agregar 1ml de etanol al 90%, centrifugar las muestras a 14000rpm durante 30 minutos y eliminar el etanol.

Dejar que el precipitado se seque toda la noche dejando los tubos abiertos invertidos o secarlos en una centrifuga al vacío durante 15 minutos.

10. Disolver el DNA en 150ul de T10E1 o en agua destilada y agregar 1-2ul de RNAsa (10mg/ml), agitar suavemente cada muestra de arriba abajo e incubar a 37°C por una hora.

11. Guardar a 4°C o a -20°C

### **I.1 Tampón de extracción CTAB 2X**

Stock	Final	l
CTAB	2%	20g
NaCl 5M	1.4M	280ml
EDTA 0.5M, pH 8.0	0.02M	40ml
Tris-HCL 1M, pH 8.0	0.1M	100ml
PVP	1%	10g
H2O destilada c.s.p		1000ml
β-mercaptoetanol	0.2%	

## **I.2 Tampón de extracción CTAB 10%**

Stock	Final	l
CTAB	10%	10g
NaCl	0.7M	4.09g
EDTA 0.5M, pH 8.0	0.02M	4ml
Tris- HCl 1M, pH 8.0	0.1M	10ml
H2O destilada c.s.p.		100ml

## **I.3 Tampón T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>**

Stock	Final	0.4l
Tris-HCl 1M, pH 8.0	0.01M	4ml
EDTA 0.5M, pH 8.0	0.001M	0.8ml
H2O destilada c.s.p.		400ml

## **I.4 Tampón para la ARNasa**

Stock	Final	5ml
ARNasa	10mg/ml	50 mg
Tris-HCl 1M, pH 7.5	10mM	50µl
NaCl 5M	15mM	15µl
H2O destilada c.s.p.		5ml

## ANEXO II Electroforesis de agarosa (CIP, 2000)

### II.1 Preparación de geles de agarosa al 1% (p/v)

Stock	Final	100ml
Agarosa	1%	1g
TBE 1X	1X	100ml
EtBr 10mg/ml	0.1µl/ml	1µl

### II.2 Tampón de carga para geles de agarosa (SALB 10X)

Stock	Final	50ml
Azul de Bromofenol	0.15%	75mg
Xilen cianol	0.15%	75mg
Naranja G	0.20%	100mg
Sucrosa	60%	30g
TBE 10X	0.5X	2,5ml
H2O destilada MiliQ		50ml
c.s.p.		

Nota: Iniciar con 10 ml de H2O destilada MiliQ.

### II.3 Tampón TBE 10X

Stock	Final	1000ml
Trizma base	90mM (10.8%)	108g
Ácido bórico	5.5%	55g
EDTA 0.5M, pH 8.0	20mM	40ml
H2O (d) c.s.p.		1000ml

### **ANEXO III Preparación del marcador Fago Lambda cortado con PstI (CIP, 2000)**

Reactivos	Cantidad
Agua libre de nucleasas	(*)
Buffer 10X para Pst I	45µl
ADN del fago lambda	50µg
Pst I [10 U/µ]	5µl
Volumen total	450µl

(\*) Volumen necesario para completar 450µl

Incubar a 37°C por 3 horas. Luego agregar 50µl de tampón de carga SALB 10X

### **ANEXO IV Preparación de gel de poliacrilamida para la electroforesis de ADN (CIP, 1999;Creste, 2001; Briard, 2000)**

#### **IV.I Preparación de placas de vidrios**

Las placas de vidrio deben ser meticulosamente limpiadas. Lavarlas con agua para remover residuos y darle una lavada final a las placas con etanol.

La placa de vidrio chica fue tratada con una solución adherente para unir covalentemente el gel con ésta, mientras que el vidrio grande con una solución repelente para asegurar la liberación del gel.

##### **IV.1.1 Placa de vidrio chico**

Preparar la solución adherente agregando 7µl de Bind Silane® a 1.5ml de etanol 95% y 7µl de ácido acético glacial.

Limpiar escurpulosamente la placa de vidrio (40 x 33 x 0.5cm) usando papel Kimwipes® humedecido con la mitad de volumen (aprox.) de la solución adherente.

Repetir, con la solución restante asegurándose que la placa de vidrio esta completamente cubierta con la solución.

#### **IV.1.2 Placa de vidrio grande**

Cambiar de guantes antes de preparar la placa de vidrio grande (42 x 33 x 0.5cm) para prevenir cruce de contaminación con la solución adherente.

Limpiar escrupulosamente la placa usando papel Kimwipes® saturado con solución repelente (Rain X®, PlusOne Repel-Silane o SigmaCote®).

Dejar secar ambos vidrios durante 30min. , luego remover el exceso de las soluciones limpiando las placas con papel Kimwipes®. Esto permite dispersar la solución de acrilamida sin formación de burbujas.

#### **IV.2 Preparación de gel denaturante de poliacrilamida**

Colocar sobre los costados de la placa de vidrio grande de los dos espaciadores (0.4 mm de grosor). Luego con el vidrio chico ensamblar las placas, a manera de un sándwich y colocar un espaciador en la parte inferior. Especial cuidado debe ser tomado para problemas de fuga, presión uniforme de los ganchos y uso adecuado de los peines.

Preparar la solución de acrilamida 6% (20:1 acrilamida:bisacrilamida) para el gel de 0.4 mm de grosor:

Reactivos	Volumen
Solución stock de acrilamida 6%	60ml
TEMED	33µl
Persulfato de amonio 10%	330µl

#### Solución stock de acrilamida 6% urea 7M

Stock	Final	1l
Urea	7M	420g
TBE 10X	0.5X	50ml
Acrilamida	6%	60g
Bisacrilamida	0.3%	3g
H2O destilada c.s.p.		1000ml

Verter la solución del gel. Asegurándose que no haya burbujas (burbujas en la parte superior del gel pueden a veces ser removidas golpeándolas). Colocar cuidadosamente los peines entre las placas de vidrio. Dejar polimerizando, horizontalmente por al menos 1,5 horas.

#### Tampón de carga para geles de poliacrilamida

Stock	Final	10.2ml
Formamida		9.6
EDTA 0.2M	0.01M	500μl
Dye		100μl

Dye	Final	1ml
Xilen cianol	5%	50mg
Azul de bromo fenol	5%	50mg
H2O destilada c.s.p.		1ml



## ANEXO V. Protocolo de secuenciamiento para pUC- 18 (Promega corporation, 2000)

1. Marcar cuatro tubos para PCR (G, A, T, C) y a cada uno añadir 2µl de la respectiva mezcla de d/ddNTP. Cubrir y guardar a 4°C hasta usar.
2. En otro tubo mezclar:

Reactivos	Cantidad
Agua libre de nucleasas c.s.p.	18µl
ADN del plásmido molde (pUC-18)	2.5µg
Tampón de secuenciamiento 5X	5µl
Iniciador pUC/M13 “forward”	4.5pmol
Taq ADN polimerasa (5U/µl)	1.1µl

3. Adicionar 4µl de la mezcla enzima / iniciador / molde, preparada en el paso 2, a cada uno de los tubos marcados del paso 1. Cubrir la mezcla con 50µl de aceite mineral.
4. Colocar los tubos en el termociclador, el cual previamente ha sido pre-calentado a 95°C y correr el siguiente programa:

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1 ciclo	95	2.0
51 ciclos	95	0.5
	42	0.5
	70	1.0
Final	4.0	hasta detener PCR

5. Después de que el programa ha terminado, añadir 3µl de la solución para detener la reacción de secuenciamiento a cada tubo de reacción.
6. Denaturar a 95 °C durante 5 minutos y cargar 5µl de cada reacción en el gel de poliacrilamida.

## **ANEXO VI Detección con tinción de plata (Promega Corporation, 2000; Creste, 2001; Briard, 2000)**

### **VI.1 Preparación de soluciones**

1. Solución fijadora/ detenedora (ácido acético glacial 10%): Agregar 100ml de ácido acético glacial a 900ml de agua destilada.
2. Solución de tinción: Disolver 1g de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y 1.5ml de formaldehído 37% en 1000ml de agua ultra pura (MiliQ)
3. Solución reveladora: Disolver 22.5g de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) en 750 ml de agua ultra pura (MiliQ). Enfriar a  $-20^\circ\text{C}$  por 30min. Inmediatamente antes de usar agregar 1,125ml de formaldehído 37% y 17 $\mu\text{l}$  de tiosulfato de sodio (100mg/ml).

### **VI.2 Procedimiento de la tinción**

1. Después de la electroforesis, separar cuidadosamente las placas de vidrio
2. Colocar la placa de vidrio con el gel unido (vidrio chico) en una bandeja de plástico.
3. Aplicar la solución fijadora/detenedora (ácido acético 10% ) y agitar suavemente por 25min. o hasta que los tintes de corrida no sean visibles. El gel puede estar toda la noche en la solución fijadora/detenedora (sin agitación). Salvar la solución fijadora para reusar.
4. Enjuagar el gel dos veces (3min. cada una) con agua ultra pura (MiliQ).
5. Impregnar el gel con la solución de tinción ( $\text{AgNO}_3$  al 0.1%) durante 30 min.

6. Remover el exceso de plata enjuagando el gel en una bandeja conteniendo 1000ml de agua ultra pura (MiliQ). Inmediatamente después de colocar el gel en la bandeja conteniendo la solución reveladora fría.
7. El tiempo total desde cuando el gel es colocado en agua ultra pura (MiliQ) al tiempo en que es colocado en la solución reveladora no debe ser mayor de 10 segundos. Exceso de este tiempo resulta en una debil tinción o nula tinción.

Nota: si el proceso de enjuague es demasiado largo, repetir el paso e con la solución de tinción.

8. Revelar el gel agitándolo bien hasta que las bandas aparezcan con la intensidad deseable (5-10 min.).
9. Parar la reacción del revelado agregando 300ml de la solución fijadora / detenedora directamente a la solución reveladora, e incubar con agitación hasta que el CO<sub>2</sub> es eliminado completamente (2-5 min, hasta que la efervescencia desaparezca).
10. Enjuagar el gel en agua ultra pura (MiliQ) durante 2min. (esta agua previamente fue usada en el último lavado).
11. Dejar secar el gel verticalmente a temperatura ambiente o usando aire frío de un secador de cabello.
12. Constante agitación durante todos los pasos de la tinción es esencial.

## ANEXO VII Correlaciones

### VI.I Correlación entre Azúcares Reductores (AR) y Fritura (F), en los tratambientes

<b>X</b>	<b>F. 10días</b>	<b>F. T.A.</b>	<b>F. C.A.</b>	<b>AR 10días</b>	<b>AR. T.A.</b>	<b>AR. C.F.</b>
<b>F. 10días</b>	1.00	0.73	0.61	<b>0.83</b>	0.76	0.74
<b>F. T.A.</b>	0.73	1.00	0.77	0.72	<b>0.68</b>	0.71
<b>F. C.F.</b>	0.61	0.77	1.00	0.58	0.62	<b>0.73</b>
<b>AR. 10días</b>	0.83	0.72	0.58	1.00	0.93	0.87
<b>AR. T.A.</b>	0.76	0.68	0.62	0.93	1.00	0.90
<b>AR. C.F.</b>	0.74	0.71	0.73	0.87	0.90	1.00

### VI.II Correlación entre Materia Seca (MA) y Absorción de aceite(AA), en los tratambientes

<b>X</b>	<b>A.A. 10días</b>	<b>A.A. T.A.</b>	<b>A.A. C.A.</b>	<b>MS 10días</b>	<b>MS. T.A.</b>	<b>MS. C.F.</b>
<b>A.A. 10días</b>	1.00	0.90	0.93	<b>-0.52</b>	-0.52	-0.53
<b>A.A. T.A.</b>	0.90	1.00	0.89	-0.56	<b>-0.56</b>	-0.58
<b>A.A. C.F.</b>	0.93	0.89	1.00	-0.49	-0.52	<b>-0.53</b>
<b>MS 10días</b>	-0.52	-0.56	-0.49	1.00	0.89	0.88
<b>MS. T.A.</b>	-0.52	-0.56	-0.52	0.89	1.00	0.98
<b>MS. C.F.</b>	-0.53	-0.58	-0.53	0.88	0.98	1.00